



Institut de Pharmacognosie et Phytochimie

**Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des
Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles :
Gnidia involucrata Steud. ex A. Rich.**

Thèse de doctorat

présentée à la

Faculté des Sciences de
l'Université de Lausanne

par

Julien Ferrari

Pharmacien diplômé de la Confédération Helvétique

Jury

Prof. Jean Hernandez, Président

Prof. Kurt Hostettmann, Directeur de thèse

Prof. Pascal Richomme, Expert

D^r Christian Terreaux, Expert

D^r Jean-Robert Ioset, Expert

LAUSANNE

2002

Imprimatur

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

Président	Monsieur Prof.	Jean Hernandez
Directeur de thèse	Monsieur Prof.	Kurt Hostettmann
Rapporteur		
Experts	Monsieur Prof.	Pascal Richomme
	Monsieur Dr	Christian Terreaux
	Monsieur Dr	Jean-Robert Ioset

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

Monsieur Julien Ferrari

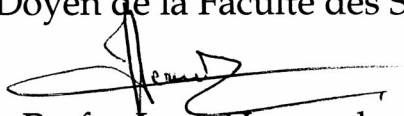
Pharmacien diplômé de la Confédération Helvétique

intitulée

**Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire
des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles :**
Gnidia involucrata Steud. ex. A. Rich.

Lausanne, le 24 juillet 2002

pour Le Doyen de la Faculté des Sciences


Prof. Jean Hernandez

A Sandrine

A mes parents

The Chamber of 32 Doors

At the top of the stairs, there's hundreds of people,
Running around to all the doors.
They try to find, find themselves an audience;
Their deductions need applause.

The rich man stands in front of me,
The poor man behind my back.
They believe they can control the game,
But the juggler holds another pack.

I need someone to believe in, someone to trust.
I need someone to believe in, someone to trust.

I'd rather trust a countryman than a townman,
You can judge by his eyes, take a look if you can,
He'll smile through his guard,
Survival trains hard.
I'd rather trust a man who works with his hands,
He looks at you once, you know he understands,
Don't need any shield,
When you're out in the field.

But down here,
I'm so alone with my fear,
With everything that I hear.
And every single door, that I've walked through
Brings me back, back here again,
I've got to find my own way.

The priest and the magician,
Singing all the chants that they have ever heard;
And they're all calling out my name,
Even academics, searching printed word.
My father to the left of me,
My mother to the right,
Like everyone else they're pointing,
But nowhere feels quite right.

And I need someone to believe in, someone to trust.
I need someone to believe in, someone to trust.

I'd rather trust a man who doesn't shout what he's found,
There's no need to sell if you're homeward bound.
If I choose a side,
He won't take me for a ride.

Back inside
This chamber of so many doors;
I've nowhere, nowhere to hide.
I'd give you all of my dreams, if you'd help me,
Find a door
That doesn't lead me back again
– take me away.

*(Genesis, The Lamb Lies Down on Broadway, 1974
– Lyrics by Peter Gabriel)*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Kurt Hostettmann, pour m'avoir accueilli au sein de son institut et permis de faire mon travail de thèse dans l'environnement stimulant d'un groupe de recherche de renommée mondiale. J'ai ainsi eu l'occasion de présenter quelques uns de mes résultats scientifiques lors de différents congrès nationaux et internationaux. Mes participations aux congrès d'Amsterdam et de Bangkok sont des expériences qui m'ont tout particulièrement marqué. Je suis également reconnaissant de la confiance qui m'a été accordée dans l'organisation d'un congrès international à Lausanne.

Mes remerciements vont aussi aux autres membres de mon jury de thèse : Monsieur le Professeur Pascal Richomme – de l'Université d'Angers –, Monsieur le Professeur Jean Hernandez et Messieurs les Docteurs Jean-Robert Ioset et Christian Terreaux – tous trois de l'Université de Lausanne. J'ai beaucoup apprécié notre interaction lors de mon examen de thèse et de ma soutenance publique.

Ma profonde reconnaissance va à Madame le Docteur Sevser Sahpaz, Maître de Conférences à l'Université de Lille, pour m'avoir guidé et soutenu lors des 6 premiers mois de ma thèse, qui ont été pour moi les plus décisifs.

Je tiens à relever ici l'excellente collaboration dont j'ai bénéficié, dans le domaine du dichroïsme circulaire, avec le laboratoire de Monsieur le Professeur Sandór Antus de l'Université de Debrecen en Hongrie. J'ai particulièrement apprécié la disponibilité et les compétences scientifiques de Monsieur le Docteur Tibor Kurtán.

Pendant ces quelque quatre années de thèse, j'ai eu beaucoup de plaisir à me consacrer aux diverses tâches d'enseignement qui m'étaient confiées. Je remercie chaleureusement les étudiants que j'ai suivis lors des travaux pratiques d'analyse pharmaceutique et de pharmacognosie et phytochimie. Les nombreux retours que j'ai eus de leur part ont été enrichissants, formateurs et parfois même très gratifiants. L'expérience de l'enseignement m'a amené un équilibre essentiel, tout en renforçant mon désir de me diriger dans cette voie. Merci surtout à Anne-Laure, Antoine, Caroline, Catherine, Fabienne et Jean-François.

Je remercie également tous mes collègues de l'Institut de Pharmacognosie et Phytochimie pour les bons moments passés ensemble. Des mentions spéciales pour Isabelle – qui a su me motiver quand il le fallait –, Johanne – ma pétillante collègue de bureau pendant ma rédaction – et Jonathan – pour sa bonne humeur communicative. Un très grand merci aussi aux ex-collaborateurs de l'Institut d'Analyse Pharmaceutique avec lesquels j'ai travaillé dans une ambiance des plus agréables : Valérie, Caroline, Agnès et Catherine.

Je ne saurais oublier mes amis Alain, Anne-Laure et Boris pour les innombrables moments forts que nous avons vécus ensemble. Sans eux, mes années de thèse auraient eu une toute autre saveur. Je pense que la « jab Co. » n'a pas fini de faire parler d'elle... et de « se mettre à l'aise » !

Finalement, des mercis à l'infini à mes parents – qui m'ont soutenu à toutes les étapes de ma jeune vie – et à Sandrine – avec qui je partage tout et qui m'aide à donner le meilleur de moi-même.

Communications scientifiques

Ce travail de thèse a été réalisé d'avril 1998 à mai 2002 à l'Institut de Pharmacognosie et Phytochimie (IPP) de l'Université de Lausanne, sous la direction de Monsieur le Professeur Kurt Hostettmann. Certains aspects de la présente recherche ont été partiellement publiés ou présentés lors de congrès internationaux sous forme de communications orales ou de posters.

Publications

Ferrari, J., Terreaux, C., Sahpaz, S., Msonthi, J.D., Wolfender, J.L., Hostettmann, K. (2000). Benzophenone glycosides from *Gnidia involucrata*. *Phytochem.* **54**, 883-889.

Ferrari, J., Terreaux, C., Kurtán, T., Antus, S., Hostettmann, K. (2002). Biflavonoid isomers from *Gnidia involucrata* (en préparation).

Communication orale

Ferrari, J., Terreaux, C., Wolfender, J.L., Hostettmann, K. (2000). Stop-flow time-slice LC/NMR and LC/MSⁿ of *Gnidia involucrata* : a rational approach for a rapid chemical screening. *11th Fall Meeting of the New Swiss Chemical Society, Lausanne, Switzerland, October 12, 2000 (Chimia 54, 406).*

Posters

Ferrari, J., Sahpaz, S., Terreaux, C., Hostettmann, K. (1999). New benzophenones from *Gnidia involucrata* Rich. (Thymelaeaceae). *2000 Years of Natural Products Research – Past, Present and Future : Joint Meeting of the ASP, AFERP, GA and PSE, Amsterdam, The Netherlands, July 26-30, 1999.*

Ferrari, J., Terreaux, C., Sahpaz, S., Msonthi, J.D., Hostettmann, K. (1999). Novel benzophenone glucosides from *Gnidia involucrata* (Thymelaeaceae). *10th Fall Meeting of the New Swiss Chemical Society, Basel, Switzerland, October 12, 1999 (Chimia 53, 359).*

Ferrari, J., Terreaux, C., Sahpaz, S., Msonthi, J.D., Hostettmann, K. (1999). Novel benzophenone glucosides from *Gnidia involucrata* (Thymelaeaceae). *International IOCD Symposium : Chemistry and Pharmacology of Asian Plants and Validation of Phytopharmaceuticals, as Satellite Meeting of The Princess Chulabhorn International Science Congress IV, Bangkok, Thailand, November 28 - December 2, 1999.*

Ferrari, J., Terreaux, C., Wolfender, J.L., Hostettmann, K. (2000). Rapid evaluation of the chemical composition of *Gnidia involucrata* by LC/NMR and LC-MSⁿ. *GA/ISE Congress, Zurich, Switzerland, September 3-7, 2000.*

Table des matières

Remerciements	v
Communications scientifiques.....	vi
Table des matières	vii
Abréviations, symboles et conventions	xii

1 Buts du travail	1
--------------------------------	----------

2 Introduction.....	5
----------------------------	----------

2.1 Sélection des plantes et des extraits	7
--	----------

2.1.1 <i>Critères de sélection du matériel végétal</i>	7
--	---

2.1.1.1 Introduction.....	7
---------------------------	---

2.1.1.2 Utilisations traditionnelles	7
--	---

2.1.1.3 Observations des plantes dans leur environnement naturel	8
--	---

2.1.1.4 Aspects botaniques et chimiotaxonomiques	9
--	---

2.1.1.5 Récolte aléatoire.....	10
--------------------------------	----

2.1.1.6 Travaux scientifiques antérieurs	11
--	----

2.1.2 <i>Critères de sélection des extraits</i>	11
---	----

2.1.2.1 Introduction.....	11
---------------------------	----

2.1.2.2 Criblages chimique et biochimique.....	12
--	----

2.1.2.3 Criblage biologique.....	12
----------------------------------	----

2.2 La famille des Thymelaeaceae.....	13
--	-----------

2.2.1 <i>Introduction</i>	13
---------------------------------	----

2.2.2 <i>Classification systématique et aspects botaniques</i>	15
--	----

2.2.3 <i>Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés dans la famille</i>	19
---	----

2.2.3.1 Introduction.....	19
---------------------------	----

2.2.3.2	Esters diterpéniques de type tigliane, daphnane et 1-alkyldaphnane	20
2.2.3.3	Coumarines	27
2.2.3.4	Flavonoïdes	32
2.2.3.5	Lignanes et composés apparentés	35
2.2.3.6	Huiles essentielles	37
2.2.3.7	Divers	39
2.2.4	<i>Considérations chimiotaxonomiques</i>	42
2.2.5	<i>Toxicité des Thymelaeaceae</i>	43
2.2.6	<i>Utilisations traditionnelles des Thymelaeaceae</i>	45
2.2.6.1	Utilisations non-médicinales	45
2.2.6.2	Utilisations médicinales	48
2.3	Présentation de <i>Gnidia involucrata</i> Steud. ex A. Rich.	52
2.3.1	<i>Introduction</i>	52
2.3.2	<i>Caractères morphologiques et répartition géographique</i>	52
3	Résultats	55
3.1	Préparation des extraits bruts	57
3.2	Criblage chimique général et analyses LC/DAD-UV préliminaires	59
3.2.1	<i>Introduction</i>	59
3.2.2	<i>Résultats et discussions</i>	60
3.3	Criblage biologique et biochimique général	63
3.3.1	<i>Introduction</i>	63
3.3.2	<i>Résultats et discussions</i>	63
3.4	Investigation phytochimique de <i>Gnidia involucrata</i>	68
3.4.1	<i>Introduction</i>	68
3.4.2	<i>Détermination de la teneur en tanins</i>	68
3.4.3	<i>Des tanins et de l'usage traditionnel de la plante</i>	70

3.4.4	<i>Elimination des tanins.....</i>	71
3.4.5	<i>Fractionnement de l'extrait méthanolique des parties aériennes.....</i>	72
3.4.6	<i>Fractionnement de l'extrait méthanolique des racines.....</i>	75
3.4.7	<i>Détermination de structure des composés A-G.....</i>	78
3.4.7.1	Composé A	78
3.4.7.2	Composé B.....	85
3.4.7.3	Composé C.....	91
3.4.7.4	« Composé D » (mélange des isomères D ₁ et D ₂)	96
3.4.7.5	Composé E.....	107
3.4.7.6	Composé F	112
3.4.7.7	Composé G	117
3.4.8	<i>De la biosynthèse des xanthones.....</i>	123
3.4.9	<i>Evaluation quantitative du pouvoir antioxydant des composés isolés.....</i>	127
3.4.10	<i>Mise en évidence de C-glycosylflavones par LC/APCI-MSⁿ.....</i>	130
3.4.11	<i>Développement d'une méthode LC/¹H-NMR pour l'évaluation rapide de la composition chimique d'un extrait brut.....</i>	133
4	Conclusions et perspectives.....	145
5	Partie expérimentale.....	155
5.1	Matériel végétal et extraction	157
5.2	Techniques de séparation analytiques	159
5.2.1	<i>Chromatographie sur couche mince (TLC)</i>	<i>159</i>
5.2.2	<i>Chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV-visible à barrettes de diodes (LC/DAD-UV).....</i>	<i>160</i>
5.2.3	<i>Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)</i>	<i>162</i>

5.2.4	<i>Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (LC/NMR)</i>	163
5.2.5	<i>Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de dichroïsme circulaire (LC/CD).....</i>	164
5.3	Techniques de séparation préparatives.....	165
5.3.1	<i>Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....</i>	165
5.3.2	<i>Filtration sur gel.....</i>	166
5.3.3	<i>Chromatographie liquide à basse pression (LPLC, Lobar)</i>	167
5.3.4	<i>Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC).....</i>	167
5.4	Méthodes physico-chimiques	168
5.4.1	<i>Mesure du point de fusion (Mp).....</i>	168
5.4.2	<i>Polarimétrie ($[\alpha]_D$)</i>	168
5.4.3	<i>Spectrophotométrie UV-visible.....</i>	169
5.4.4	<i>Spectrométrie de masse (MS).....</i>	171
5.4.5	<i>Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (NMR).....</i>	172
5.5	Méthodes chimiques et biochimique de criblage.....	173
5.5.1	<i>Réactifs de révélation chimique sur TLC.....</i>	173
5.5.2	<i>Mise en évidence de l'activité antiradicalaire sur le DPPH.....</i>	175
5.5.3	<i>Mise en évidence de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase</i>	177
5.6	Méthodes biologiques de criblage.....	177
5.6.1	<i>Mise en évidence de l'activité antifongique sur Cladosporium cucumerinum par bioautographie directe</i>	177
5.6.2	<i>Mise en évidence de l'activité antifongique sur Candida albicans par bioautographie « agar overlay »</i>	178
5.6.3	<i>Mise en évidence de l'activité antibactérienne sur Bacillus subtilis par bioautographie « agar overlay »</i>	180

5.6.4	Mise en évidence de l'activité larvicide sur <i>Aedes aegypti</i>	182
5.6.5	Mise en évidence de l'activité molluscicide sur <i>Biomphalaria glabrata</i>	183
5.7	Réactions chimiques simples	184
5.7.1	Acétylation.....	184
5.7.2	Méthylation.....	184
5.7.3	Hydrolyse acide.....	185
5.8	Dosage des tanins dans <i>Gnidia involucrata</i>	185
5.8.1	Principe	185
5.8.2	Mode opératoire	186
5.9	Constantes physiques et données spectrales des composés isolés	188
6	Références	199
7	Résumé	221
8	Abstract.....	225

Abréviations, symboles et conventions

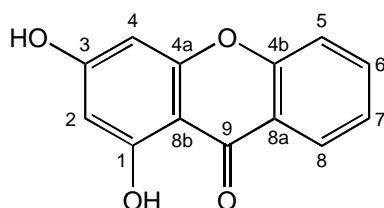
$[\alpha]_D$	pouvoir rotatoire à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589,3 nm)
δ	déplacement chimique (<i>NMR</i>)
ε	coefficient d'extinction molaire (<i>UV</i> et <i>CD</i>)
A, B, C,...	désignation des composés naturels isolés dans le présent travail
APCI	ionisation chimique à pression atmosphérique (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization, MS</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (catalogue de microorganismes)
CC	chromatographie sur colonne ouverte (<i>Column Chromatography</i>)
CD	spectrométrie de dichroïsme circulaire (<i>Circular Dichroism spectroscopy</i>)
<i>d</i>	Doublet (<i>NMR</i>)
Da	Dalton (unité de masse moléculaire)
DAD	détecteur à barrettes de diodes (<i>Diode Array Detector, UV</i>)
D/CI	ionisation chimique par désorption (<i>Desorption/Chemical Ionization, MS</i>)
DCM	DiChloroMéthane
<i>dd</i>	Double Doublet (<i>NMR</i>)
DEPT	<i>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (<i>NMR</i>)
d.i.	diamètre interne (colonnes <i>HPLC</i>)
DMSO- <i>d</i> ₆	DiMéthylSulfOxyde hexaDeutérié (<i>NMR</i>)
DPPH	radical 1,1-DiPhényl-2-PicrylHydrazyle
EI	ionisation par impact électronique (<i>Electron Impact ionization, MS</i>)
ép.	épaulement (observé sur les spectres <i>CD</i> et <i>UV</i>)
ESI	ionisation par électrospray (<i>ElectroSpray Ionization, MS</i>)
EtOH	éthanol
GB	biflavonoïdes typiques des Clusiaceae évoluées (<i>Garcinia Biflavonoids</i>)
dqfCOSY	<i>Double Quantum Filtered COrrrelation SpectroscopY</i> (<i>NMR</i>)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i> (<i>NMR</i>)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> (<i>NMR</i>)
HPLC	chromatographie liquide à haute performance (<i>High Performance LC</i>)
hr	Haute Résolution (<i>High Resolution, MS</i>)
IC ₅₀	concentration inhibitrice de 50 % (<i>Inhibitory Concentration of 50 %</i>)

int. rel.	intensité relative (<i>MS</i>)
IT	analyseur à piège d'ions (<i>Ion Trap analyzer, MS</i>)
<i>J</i>	constante de couplage (<i>NMR</i>)
LC	chromatographie liquide (<i>Liquid Chromatography</i> , terme générique)
LPLC	chromatographie liquide à basse pression (<i>Low Pressure LC</i>)
<i>m</i>	Multiplet (<i>NMR</i>)
MeCN	acétonitrile
MeOH	méthanol
MeOH- <i>d</i> ₄	méthanol tétraDeutérié (<i>NMR</i>)
Mp	point de fusion (<i>Melting Point</i>)
MPLC	chromatographie liquide à moyenne pression (<i>Medium Pressure LC</i>)
<i>M_r</i>	poids moléculaire (<i>Molecular weight</i>)
MS	spectrométrie de masse (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS ^{<i>n</i>}	spectrométrie de masse tandem à plusieurs étapes (<i>multiple stage tandem MS</i>)
MTT	bromure de 3-(4,5-diMéthyl-2-Thiazolyl)-2,5-diphényl-2 <i>H</i> -Tétrazolium
<i>m/z</i>	rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires d'ions (<i>MS</i>)
NMR	spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (<i>Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</i>)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i> (<i>NMR</i>)
PEHD	PolyEthylène de Haute Densité
ppm	unité de δ (Parties Par Million, <i>Parts per Million</i> = 10 ⁻⁶ , <i>NMR</i>)
R _f	facteur de rétention (<i>Retention Factor, TLC</i>)
RP	phase inverse (<i>Reversed Phase</i> , phases stationnaires en chromatographie)
<i>s</i>	Singulet (<i>NMR</i>)
s 1, s 2, s 3,...	désignation des composés naturels mentionnés dans l'introduction
sp.	espèce botanique non précisée
spp.	plusieurs espèces du même genre botanique
<i>t</i>	Triplet (<i>NMR</i>)
TFA	acide trifluoroacétique (<i>TriFluoroAcetic acid</i> , acidifiant pour phases mobiles)
THF	TétraHydroFuranne
TLC	chromatographie sur couche mince (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TMS	TétraMéthylSilane (<i>NMR</i> , référence pour l'échelle des δ)
UV	spectrophotométrie/rayonnement dans le domaine de l'Ultra-Violet

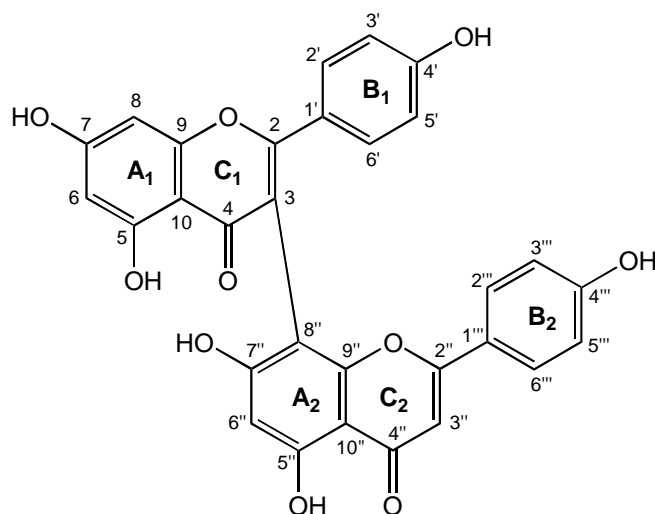
Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment rencontrée dans la littérature. C'est pourquoi elles sont surtout issues de la terminologie anglo-saxonne.

Les couplages analytiques entre une méthode de séparation et une (ou plusieurs) méthode(s) de détection sont indiqués par les abréviations successives de ces dernières, séparées par le signe « / » : LC/UV, LC/MS, LC/NMR,... Lorsqu'il s'agit d'indiquer le type précis de détection, on le fera à l'aide des abréviations correspondantes placées avant celles désignant la méthode générale et séparées par un trait d'union : DAD-UV, EI-MS, D/CI-MS, APCI-MS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR,...

La numérotation biogénétique des xanthones a été adoptée dans le présent travail, du fait de son usage courant dans la littérature.



Les structures des biflavonoïdes ont été numérotées selon les travaux les plus récents dans le domaine.



1 Buts du travail

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels de domaines tels que la biotechnologie et la chimie computationnelle. Cela tient principalement au fait que le règne végétal est une source présumée inépuisable d'une immense variété de médicaments potentiels, tout en étant accessible au plus grand nombre, y compris dans les pays en voie de développement ! De plus, cette science évolue et s'affine sans cesse avec l'amélioration des instruments d'investigation (méthodes préparatives et analytiques, tests de dépistage d'activité) et de l'accès à l'information scientifique. La pharmacognosie et la phytochimie sont donc en totale adéquation avec les objectifs d'une recherche moderne de composés à visée thérapeutique.

Parmi les nombreuses manières d'appréhender l'étude des végétaux, évoquées dans la première partie du présent mémoire, aucune ne prévaut sur les autres : tout est dans le but fixé, qui peut d'ailleurs être multiple et changer en cours de route... C'est ce qui fait en grande partie l'intérêt de notre domaine, situé à l'interface de nombreuses sciences appliquées, comme la pharmacie, la chimie, la biologie et la médecine.

Le travail entrepris dans le cadre de cette thèse se propose d'approfondir les connaissances sur une famille botanique méconnue, jouissant pourtant d'une répartition géographique très étendue : les Thymelaeaceae. A l'origine, les représentants de cette famille ont été regroupés, sur des critères morphologiques très vagues, presque par défaut d'autres taxons pour les accueillir. Bien que les récents développements dans le domaine de la classification phylogénétique aient permis de consolider ce regroupement, il est du rôle du phytochimiste d'apporter des éclaircissements au niveau du métabolisme secondaire des végétaux, afin de vérifier l'existence d'une cohérence chimique au sein de la famille. C'est en effet à ce niveau que s'exprime l'immense variabilité structurale des molécules, si chère au chercheur impliqué dans le développement de nouveaux médicaments.

Il est intéressant de constater que les nombreux emplois traditionnels des Thymelaeaceae sont répandus à travers le monde et ont parfois convergé, même en l'absence de tout contact entre les différentes cultures. Parmi les utilisations, parfois séculaires, des plantes de cette famille, les chercheurs ont ainsi été intrigués par celles qui découlaient de leurs propriétés cytotoxiques. C'est pourquoi une intense recherche a été menée depuis plus de 70 ans sur la

classe des diterpènes irritants, considérés à ce jour comme les marqueurs chimiotaxonomiques les plus évidents des Thymelaeaceae, afin d'élargir l'arsenal thérapeutique dans la lutte contre les différentes formes de cancers.

Cette étude ciblée à grande échelle a certes eu l'avantage de mettre en évidence la très grande diversité structurale de cette classe prometteuse de métabolites, mais malheureusement l'isolement d'autres types de métabolites des Thymelaeaceae en a presque été considéré comme anecdotique. C'est pourquoi, le présent travail a pour but d'adopter une autre approche scientifique de cette famille, par l'investigation approfondie des fractions polaires de représentants peu ou pas étudiés, avec l'espoir d'aboutir à une découverte enrichissante...

Certaines techniques analytiques couplées de pointe, comme la LC/NMR et la LC/MS, seront également utilisées dans le cadre de ce travail afin d'en montrer les applications futures dans le domaine de la déréplication d'extraits bruts. Les implications de cette démarche dépassent sensiblement le cadre de l'investigation phytochimique des Thymelaeaceae, car elles offrent des perspectives beaucoup plus générales à l'étude du matériel vivant, qu'il soit végétal ou animal.

Finalement, la pertinence du présent travail sera étayée par la mise en évidence des nouvelles voies de recherche qu'il aura permis d'envisager.

2 Introduction

2.1 Sélection des plantes et des extraits

2.1.1 Critères de sélection du matériel végétal

2.1.1.1 Introduction

La sélection du matériel végétal est la première étape dans une étude phytochimique. Du soin avec lequel elle sera réalisée dépend en grande partie le succès du travail entrepris par la suite. Les critères suivants peuvent guider le phytochimiste lors de la récolte de plantes :

- utilisations traditionnelles des plantes par la population locale ;
- observation des plantes dans leur environnement naturel ;
- aspects botaniques et chimiotaxonomiques.

Cependant, le chercheur peut également décider de procéder à une récolte aléatoire. Dans la pratique, plusieurs de ces approches sont généralement combinées et l'aide d'un botaniste connaissant bien la flore locale est indispensable. Bien sûr, les espèces végétales protégées sont exclues d'une telle démarche et les patrimoines culturels et naturels des pays concernés par les récoltes de plantes doivent absolument être respectés.

Avant d'entreprendre l'étude phytochimique à proprement parler, le chercheur devra encore se renseigner sur d'éventuels travaux scientifiques antérieurs (études phytochimiques, ethnobotaniques, etc.).

2.1.1.2 Utilisations traditionnelles

Bien que les aspects traditionnels et scientifiques semblent souvent s'opposer dans notre culture, il peut être très profitable de tirer des enseignements des utilisations traditionnelles de certaines plantes aussi bien comme médicament que comme poison. En effet, certains

usages profitent de plusieurs siècles d'observations empiriques et ne sont pas à négliger. Il ne faut cependant pas oublier que cette approche est limitée du fait que les méthodes de diagnostic diffèrent grandement entre les médecines occidentale et traditionnelles. Ainsi, pour traiter une schistosomiase urinaire, diagnostiquée sur la base de la seule présence de sang dans les urines, des guérisseurs africains utilisent des plantes dont l'étude phytochimique montre la richesse en naphthoquinones. Or, ces molécules ont une analogie structurale avec la vitamine K, et c'est donc en favorisant la coagulation qu'elles font disparaître le symptôme jugé caractéristique (Hostettmann, 1997). L'étendue des maux est également variable et dans certaines cultures, il n'est pas rare de voir invoquer des causes surnaturelles à une pathologie. Ce domaine échappe alors à toute corrélation entre l'usage traditionnel et l'étude scientifique de la plante.

Cependant, il existe des cas pour lesquels une utilisation traditionnelle peut révéler un potentiel intéressant à exploiter en médecine occidentale. Il s'agit des usages des plantes comme antibiotiques, antiseptiques, laxatifs, anticancéreux, analgésiques, psychotropes, vésicants, etc., pour lesquels une preuve scientifique peut être apportée au travers de tests sur une cible appropriée (microorganisme, animal, organe, culture cellulaire, système enzymatique).

Notons encore que les poisons de chasse peuvent être une source non négligeable de composés de tête dans la recherche sur le cancer, comme le montre l'exemple des Thymelaeaceae, étudiées dans le présent travail. Cette famille a également des usages variés dans les diverses médecines traditionnelles africaines, qui sont dignes d'intérêt et qui seront évoqués dans le chapitre 2.2.6.

2.1.1.3 Observations des plantes dans leur environnement naturel

Chez les végétaux, comme chez les autres organismes vivants, des enzymes spécifiques participent à la formation de petites molécules qui constitueront les éléments de base des macromolécules : protéines, acides nucléiques, polysaccharides et lipides. Leur synthèse caractérise les cellules ou les organismes en croissance et constitue le métabolisme primaire.

En outre, les végétaux ont la particularité de présenter un important métabolisme secondaire : ils synthétisent un grand nombre de substances chimiques, appelées métabolites secondaires, qui trouvent leur origine dans les produits du métabolisme primaire. Leur rôle n'est pas bien établi, mais il semblerait que certaines de ces molécules possèdent des fonctions précises comme pigment ou substance de signal (attraction d'insectes pollinisateurs), phytohormone, substance de défense (insectes, herbivores, stress oxydatif) ou précurseur de synthèse (Richter, 1993).

Lorsque le phytochimiste est sur le terrain, l'observation du milieu dans lequel vit et évolue un organisme végétal peut donc lui donner des indices sur la constitution de son métabolisme secondaire. Par exemple, une plante qui pousse dans un milieu chaud et humide, devra faire face à de nombreuses attaques par des microorganismes (bactéries, champignons microscopiques) et des insectes herbivores. Le fait que le végétal ait une apparence intacte dans un tel environnement, pourra laisser penser qu'il a trouvé un moyen de se défendre.

L'approche décrite ci-dessus est particulièrement utile dans la recherche de substances à propriétés antifongiques, antibactériennes, antivirales, insecticides, antioxydantes, attractives, répulsives, etc.

2.1.1.4 Aspects botaniques et chimiotaxonomiques

Le métabolisme secondaire évoqué au point précédent fait également partie des critères de classification des végétaux. On parle alors de classification chimique ou chimiotaxonomie. Il est d'ailleurs intéressant de constater que les systèmes de classification morphologiques sont souvent confirmés par l'étude chimiotaxonomique. Cependant, lorsque la classification par des critères macroscopiques fait défaut, il arrive qu'une étude du métabolisme secondaire participe au regroupement, au sein de taxons cohérents, d'espèces difficiles à classer. Une approche encore plus moderne consiste à étudier à cette même fin des séquences de gènes ou d'ADN, comme nous le montrerons plus loin dans le cas de la classification des Thymelaeaceae (*cf.* 2.2.2).

Au phytochimiste, la chimiotaxonomie dit donc que si une espèce possède un potentiel thérapeutique intéressant grâce aux substances qu'elle synthétise, une espèce appartenant au même genre ou à la même famille aura plus de chances de se révéler également prometteuse dans ce domaine. Pour le systématicien, l'étude du métabolisme secondaire sera un critère complémentaire à l'étude morphologique des végétaux.

L'étude d'une même plante poussant dans des milieux (sols, climats, saisons) différents, peut également amener à constater des variations dans le métabolisme secondaire. C'est par exemple le cas pour certaines Lamiaceae (thym, romarin, menthe, etc.), chez lesquelles il est possible de définir des races chimiques précises selon la composition qualitative et quantitative de leur huile essentielle (p. ex. : thym à thymol, à carvacrol ou à linalol).

Les aspects de géobotanique sont également intéressants, car une plante qui est endémique d'une région doit certainement posséder des caractéristiques évolutives particulières et donc pouvoir fournir des substances chimiques nouvelles.

2.1.1.5 Récolte aléatoire

Il s'agit cette fois-ci de s'en remettre à la chance, avec néanmoins une once de bon sens. Comme le réservoir des végétaux supérieurs est immense, avec une estimation d'env. 500 000 espèces dont à peine la moitié est connue et une petite fraction a été étudiée (Principe, 1989), cette approche a de bonnes chances d'aboutir à l'isolement de produits nouveaux. Lorsqu'on connaît l'immense potentiel créatif de la nature en termes chimiques, et le très grand nombre de molécules synthétisées par un organisme végétal entier, on se rend vite compte que la statistique est du côté du chercheur !

Pour l'anecdote, la faculté de trouver des choses précieuses ou utiles sans les avoir cherchées est appelée sérendipité, terme inventé par l'écrivain anglais Horace Walpole (1717-1797) en référence à l'histoire des Trois princes de Serendip, qui découvraient constamment des choses qu'ils ne cherchaient pas. Rappelons-nous de la découverte des propriétés inhibitrices de la

phosphodiesterase du sildénafil (Viagra), alors en développement pour le traitement de certains troubles cardiovasculaires...

2.1.1.6 Travaux scientifiques antérieurs

Dans l'optique d'augmenter ses chances d'isoler de nouveaux produits naturels issus des plantes, le chercheur sera souvent tenté de s'intéresser aux espèces qui n'ont pas, ou très peu, été étudiées jusque-là. Cependant, le scientifique averti pourra également faire des découvertes dignes d'intérêt en investiguant une plante largement étudiée sous un angle nouveau : autre organe ou extrait, technique analytique nouvelle, cible biologique différente, etc. Dans les deux cas, une recherche de littérature approfondie devra précéder le début des processus d'extraction.

2.1.2 Critères de sélection des extraits

2.1.2.1 Introduction

« Le chemin qui mène de la plante à ses constituants purs est très long » (Hostettmann, 1997). Cette affirmation démontre à elle seule l'importance d'une prise en charge rationnelle du matériel végétal, dès qu'il a été sélectionné pour l'investigation phytochimique selon les critères évoqués plus tôt. Pour ce faire, le phytochimiste a à sa disposition des méthodes d'évaluation des extraits bruts, qui sont regroupées dans les classes suivantes: criblages chimique, biochimique et biologique.

Un autre critère de choix, parfois oublié, mais qui peut se révéler de la première importance, est la quantité d'extrait brut à disposition. Quoi de plus frustrant en effet, que d'entreprendre le long fractionnement d'un extrait, pour finalement constater qu'il fallait plus de matériel pour isoler des quantités suffisantes à l'identification des composés purs !

2.1.2.2 Criblages chimique et biochimique

Cette catégorie englobe toutes les analyses préalables par chromatographie sur couche mince (TLC) avec détection chimique, biochimique ou spectroscopique. Les observations visuelles effectuées sous les lampes UV à 254 nm et 366 nm et après vaporisation de réactifs de dérivatisation sur TLC peuvent nous donner une première idée sur les classes de substances composant les extraits criblés. Dans notre laboratoire, nous disposons en outre de tests sur TLC permettant d'évaluer les potentiels antioxydant (réactif au DPPH) et inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AChE) des extraits. Ces différents tests sont discutés en détail au chapitre 5.5.

Les analyses par HPLC/UV, couplée ou non à la MS, peuvent également nous donner de précieuses indications quant au contenu des extraits et guider notre choix. Il s'agit ici de méthodes analytiques possédant une très bonne résolution et un seuil de détection de l'ordre du µg (UV) ou du ng (MS). Ces techniques sont présentées au chapitre 5.2

2.1.2.3 Criblage biologique

Afin de mettre tout en œuvre pour isoler des produits potentiellement bioactifs, il importe de disposer d'une série de tests biologiques rapides, fiables et pertinents, ne nécessitant que peu de matériel et n'exposant le manipulateur qu'à un minimum de risques. Grâce à ces tests, les extraits bruts peuvent être évalués quant à leur potentiel, tout en gardant à l'esprit qu'il s'agit d'une approche forcément subjective. En effet, des extraits inactifs contre les cibles choisies ont peut-être des substances actives en très faible concentration ou peuvent posséder d'autres potentiels non évalués.

Dans notre laboratoire, les activités biologiques recherchées sont les suivantes : larvicide sur *Aedes aegypti*, antifongiques sur *Candida albicans* et *Cladosporium cucumerinum*, bactéricide sur *Bacillus subtilis* et molluscicide sur *Biomphalaria glabrata*. Ces différents tests sont discutés en détail au chapitre 5.6.

2.2 La famille des Thymelaeaceae

2.2.1 Introduction

Le choix des Thymelaeaceae comme sujet général du présent travail a été guidé par les nombreuses utilisations traditionnelles qui en sont répertoriées, mais aussi par le fait qu'il s'agit d'une famille relativement méconnue, comme le démontrent les difficultés rencontrées dans leur classification botanique.

Les Thymelaeaceae sont une petite famille de dicotylédones composée de quelque 1200 espèces réparties en 67 genres, bien que certains auteurs n'en répertorient qu'une cinquantaine. Les membres de cette famille sont répandus dans les zones tropicales et tempérées de la planète, particulièrement en Afrique, et sont absents seulement dans les régions aux climats les plus froids (Borris *et al.*, 1988 ; *cf.* Figure 2.1).

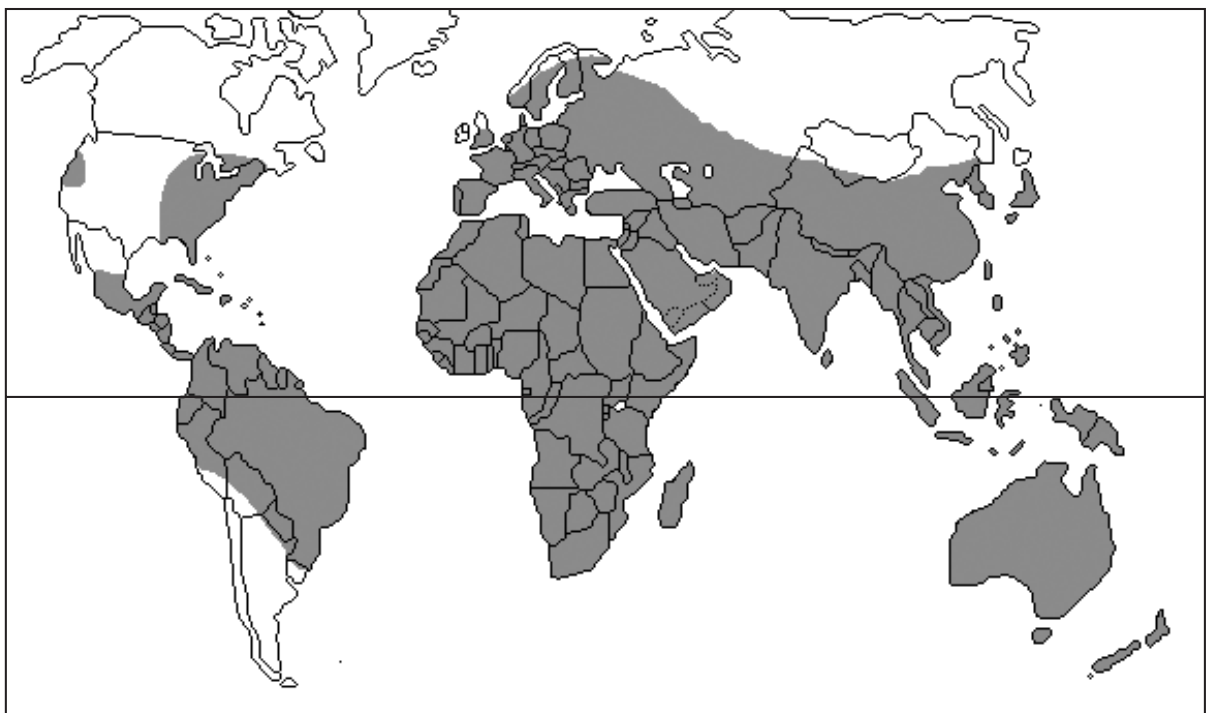


Figure 2.1 – Carte de répartition géographique des Thymelaeaceae d'après Heywood (1996).

Bien qu'il s'agisse d'un taxon hétérogène et relativement petit, les Thymelaeaceae ont des utilisations très variées, leur conférant une importance économique non négligeable dans les régions où elles poussent. Des espèces des genres *Daphne*, *Dais*, *Dirca* et *Pimelea* sont par exemple cultivées comme arbustes ornementaux aux fleurs parfois persistantes et généralement parfumées. L'écorce de plusieurs genres – particulièrement *Wikstroemia*, *Daphne*, *Edgeworthia* et *Thymelaea* – est utilisée pour la fabrication locale de papier. De l'encens est également recueilli après incision du tronc de certaines espèces de *Wikstroemia*. Dans certaines régions méditerranéennes, l'écorce des espèces de *Daphne* est utilisée pour étourdir chimiquement les poissons. Aux Antilles, *Lagetta linearia* Lam., ou « arbre à dentelle », fournit une écorce décorative (Heywood, 1996 ; Watson et Dallwitz, dès 1992). D'autres utilisations traditionnelles (chasse, médecine,...) seront discutées plus loin en détail.

En Europe occidentale, les Thymelaeaceae sont représentées par une dizaine d'espèces appartenant aux genres *Thymelaea* et *Daphne*. Les *Daphne* indigènes sont des arbrisseaux ou des sous-arbrisseaux spontanés, parfois cultivés à des fins ornementales (Bruneton, 1999). Selon la *Flora Helvetica* (Lauber et Wagner, 2000), les Thymelaeaceae sont représentées en Suisse par les espèces suivantes : *Daphne mezereum* L. (« bois gentil », mézéréon), *D. alpina* L. (daphné des Alpes), *D. striata* Trattinick (daphné strié), *D. cneorum* L. (daphné camélée), *D. laureola* L. (laurier des bois) et *Thymelaea passerina* (L.) Cosson et Germ. (syn. *Passerina annua* Wikstr., passerine annuelle). À part le « bois gentil », qui est un arbrisseau des sous-bois commun dans toute la Suisse, les autres espèces citées ont une aire de distribution restreinte et sont protégées sur le territoire helvétique.

Les Thymelaeaceae sont réputées toxiques de par leur teneur en esters diterpéniques de type tiglane ou daphnane, composés qui ont une distribution restreinte à deux familles seulement : les Thymelaeaceae et les Euphorbiaceae (Bruneton, 1999) !

2.2.2 Classification systématique et aspects botaniques

La position taxonomique des Thymelaeaceae a toujours été sujette à caution, comme l'ont relevé Borris *et al.* (1988), avant même l'avènement des classifications phylogénétiques moléculaires. Engler et Gilg (1924) ont d'abord placé cette famille dans le sous-ordre des Thymelaeineae de l'ordre des Myrtiflorae, ensemble avec les Geissolomataceae, les Penaeaceae, les Oliniaceae et les Elaeagnaceae. Wagenitz et Melchior, dans la 12^{ème} édition du *Syllabus der Pflanzenfamilien* d'Engler, ont déplacé les Oliniaceae dans le sous-ordre des Myrtinae et élevée le reste des Thymelaeineae au rang d'ordre, sous l'appellation de Thymelaeales (Wagenitz, 1964 ; Melchior, 1964). Cet ordre a été validé par Gundersen (1950), avec cependant la ré-introduction des Oliniaceae et le fait qu'il considère les Geissolomataceae comme faisant partie des Penaceae. Hutchinson (1967) supprime les Oliniaceae des Thymelaeales, mais y introduit les Nyctaginaceae et divise les Thymelaeaceae d'Engler en trois familles : Thymelaeaceae, Gonystylaceae et Aquilariaceae. Quant à Cronquist (1968), il inclut les Thymelaeaceae, les Penaeaceae, les Oliniaceae et dix autres familles dans son ordre des Myrtales de la sous-classe des Rosidae.

Dans un article sur la morphologie florale des Thymelaeaceae, Heining (1951) a examiné la confusion régnant dans les relations taxonomiques au sein de cette famille. Sur la base de la morphologie florale, il y est affirmé que les Thymelaeaceae peuvent être apparentées aux Tiliaceae ou aux Flacourtiaceae, mais certainement pas aux familles des Rosales, aux Elaeagnaceae, aux Proteaceae et aux Nyctaginaceae. Des caractéristiques de morphologie pollinique ont amené Erdtman (1952) à conclure que les Thymelaeaceae peuvent être très fortement apparentées aux membres crotonoïdes des Euphorbiaceae et aux Buxaceae, mais pas aux familles suivantes : Celastraceae, Combretaceae, Dichapetalaceae, Elaeagnaceae, Flacourtiaceae, Penaeaceae, Proteaceae et Tiliaceae.

La conclusion d'Erdtman concernant la proximité systématique des Thymelaeaceae et des Euphorbiaceae est partagée par Thorne (1968), et se trouve étayée par le fait que des esters d'alcools diterpéniques des types tiglane et daphnane n'ont été isolés que dans les membres de ces deux familles.

Au sein des Thymelaeaceae, Wagenitz (1964) a reconnu 48 genres, dont 31 ont été mentionnés et distribués dans quatre sous-familles et huit tribus, selon le schéma présenté dans la Figure 2.2 :

- Famille : Thymelaeaceae
 - Sous-famille : Gonystyloideae
 - Sous-famille : Aquilarioidea
 - Tribu : Microsemmetaceae
 - Tribu : Solmsieae
 - Tribu : Octolepideae
 - Tribu : Aquilarieae
 - Sous-famille : Gilgiodaphnoideae
 - Sous-famille : Thymelaeoideae
 - Tribu : Dicranolepideae
 - Tribu : Phalerieae
 - Tribu : Daphneae
 - Tribu : Thymelaeae (Gnidieae)

Figure 2.2 – Classification de la famille des Thymelaeaceae selon le système de Wagenitz.

Hutchinson (1967) a reconnu 50 genres (y compris les Gonystylaceae et les Aquilariaceae), mais ne les regroupe pas en sous-familles ou tribus. Les sous-familles Gonystyloideae et Aquilarioideae de Wagenitz sont à peu près équivalentes aux familles Gonystylaceae et Aquilariaceae décrites par Hutchinson. Cependant, dans la monographie de Gilg (1984), 49 genres sont répertoriés et répartis au sein du système de Wagenitz. Cette dernière classification est la plus couramment acceptée de nos jours et nous nous y référons donc dans ce travail.

Alors qu'il existe un accord fondamental entre les différents auteurs en ce qui concerne les quelque 200 familles reconnues, il n'existe aucun consensus pour ce qui est du niveau supérieur, l'ordre, et les différents systèmes de classification sont très variables quant au nombre d'ordres, leur nom et leur contenu. Pour y voir plus clair, il a fallu attendre le

perfectionnement des méthodes de classification phylogénétiques moléculaires à la fin des années 80.

La dernière décennie a vu se développer la cladistique moderne, ou systématique moléculaire, basée sur l'analyse de séquences de gène ou d'ADN, et dont le principe fondamental est que la preuve d'une parenté phylogénétique entre différents taxons n'est fournie que s'ils partagent les mêmes caractères dérivés (synapomorphies). Le gène le plus utilisé dans cette approche est *rbcL*, qui code pour la grande (L = *large*) sous-unité de RUBISCO, une des enzymes les plus importantes de la photosynthèse (Spichiger *et al.*, 2000). Les travaux dans ce domaine ont culminé en 1998 avec la publication d'une nouvelle classification ordinaire des plantes à fleurs par un groupe de chercheurs : *the Angiosperm Phylogeny Group* (APG, 1998).

Ainsi, la délimitation de l'ordre des Malvales par Alverson *et al.* (1998), reprise par l'APG, se base sur l'analyse de 125 séquences de *rbcL* et on y retrouve les Thymelaeaceae, qui étaient jusque-là souvent associées aux Myrtales. La classification des Thymelaeaceae dans l'ordre des Malvales « étendu » est d'ailleurs confortée par d'autres caractères, comme par exemple la présence d'acides gras cyclopropaniques (Vickery, 1980 et 1981), de cellules mucilagineuses et d'écorces fibreuses robustes (Dahlgren et Thorne, 1984) dans cette famille.

Des recherches supplémentaires sont encore nécessaires pour identifier des synapomorphies morphologiques qui étayeront le caractère monophylétique des Thymelaeaceae, *i.e.* leur évolution à partir d'un seul ancêtre commun (Alverson *et al.*, 1998).

La Figure 2.3 représente la position systématique des Thymelaeaceae à la lumière des connaissances actuelles. La plupart des auteurs contemporains considèrent le taxon Thymelaeaceae au sens large (*s.l.*) et c'est cette approche qui est reprise dans le présent travail, bien que les espèces étudiées appartiennent toutes à la sous-famille des Thymelaeoideae (Thymelaeaceae au sens strict, *s.s.*).

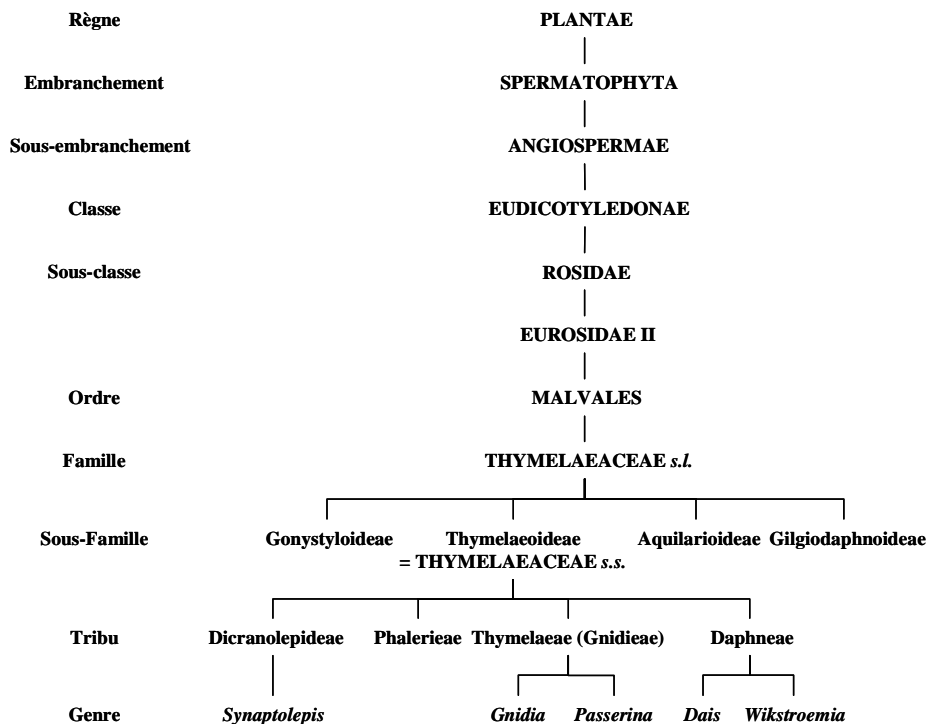


Figure 2.3 – Position systématique des Thymelaeaceae d’après APG (1998) et Gilg (1984).

Les genres indiqués sont ceux qui ont été étudiés dans le présent travail.

Les Thymelaeaceae s.l. sont principalement des arbustes et leurs caractères morphologiques principaux sont les suivants (Heywood, 1996) :

- feuilles : alternes (rarement opposées) ;
- fleurs :
 - régulières, gén. bisexuées, pièces florales normalement par 4 ou 5,
 - regroupées en racèmes, en capitules ou en fascicules,
 - en forme de coupe, le réceptacle creux formant un tube profond dont le bord porte généralement les pièces florales,
 - sépales pétaloïdes, apparaissant comme une continuité du tube,
 - étamines insérées dans le tube et corolle insignifiante ou absente,
 - ovaire supère à style simple, fixé à la base du réceptacle, possédant 1 ou 2 (rarement 3 à 8) carpelles soudés, avec autant de loges renfermant chacune 1 ovule pendant axile ou pariétal ;
- fruit :
 - akène, baie, drupe ou parfois capsule,
 - graine possédant peu ou pas d’albumen, embryon droit.

La plupart des genres appartiennent à la sous-famille des Thymelaeoideae (Thymelaeaceae s.s. ; ovule unique et pendant), dans laquelle on retrouve une quarantaine de genres, dont les plus importants sont :

- *Gnidia* : 100 espèces de l'Afrique à Madagascar et de l'Inde à Ceylan ;
- *Pimelea* : 80 espèces en Australasie ;
- *Wikstroemia* : 70 espèces en Australasie jusqu'au sud de la Chine ;
- *Daphne* : 70 espèces en Australasie, de l'Asie en Europe et l'Afrique du Nord ;
- *Lasiosiphon* : 50 espèces couvrant la même aire que *Gnidia*.

Les Aquilarioideae (2 ovules pendants, rarement plus) comprennent 7 petits genres de la région du Pacifique et d'Afrique, et le genre *Octolepis*, de l'Afrique de l'Ouest, avec un ovaire à 4 ou 5 loges, le fruit étant une capsule.

Les Gonystyloideae regroupent 3 petits genres du sud-est de l'Asie et de Bornéo, dont *Gonystylus*, qui est pourvu de nombreuses étamines.

Finalement, la sous-famille des Gilgiodaphnoideae n'est constituée que d'un seul genre (*Gilgiodaphne*) endémique de l'Afrique de l'Est tropicale, possédant 4 étamines et 4 staminodes (étamines stériles) soudées en tube (Heywood, 1996).

2.2.3 Etudes phytochimiques antérieures et principaux métabolites secondaires isolés dans la famille

2.2.3.1 Introduction

Les Thymelaeaceae ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques dans les 70 dernières années (Borris *et al.*, 1988). L'intérêt initial devait être motivé par la toxicité marquée de ces plantes, mais l'utilisation médicinale répandue de certaines espèces a sans

aucun doute contribué à le nourrir. Mais ne nous y trompons pas, les Thymelaeaceae sont une famille très peu étudiée si l'on considère la pléthore de publications consacrées aux Asteraceae et aux Fabaceae par exemple. C'est pourquoi la famille à laquelle est consacré ce travail constitue encore aujourd'hui une source intéressante de produits naturels nouveaux et potentiellement actifs.

Ce chapitre a pour but de donner un aperçu de la variété des métabolites secondaires produits par les Thymelaeaceae, ainsi que de leurs activités biologiques. Il ne s'agit donc pas d'une liste exhaustive, car seuls les composés les plus représentatifs sont répertoriés. Un accent particulier a été mis sur la classe des diterpènes des Thymelaeaceae, de par leur rôle majeur dans la toxicité de ces plantes, mais également dans l'utilisation de celles-ci en médecine traditionnelle.

2.2.3.2 Esters diterpéniques de type tigliane, daphnane et 1-alkyldaphnane

Il s'agit sans aucun doute de la classe de composés la plus caractéristique des Thymelaeaceae. Comme nous l'avons relevé précédemment, seule une autre famille produit ce type de métabolites secondaires : les Euphorbiaceae. Ces diterpènes peuvent se retrouver dans toutes les parties de la plante (racine, tige, feuille, fruit, graine), sont fortement irritants pour les muqueuses et possèdent des propriétés vésicantes. Ceci explique que l'écorce de certains *Daphne* était autrefois utilisée avec les mêmes indications que la cantharide (Hegnauer, 1973) !

La nature chimique des diterpènes toxiques des Thymelaeaceae n'est connue que depuis une trentaine d'années et, bien que d'une grande variété structurale, ils dérivent tous des squelettes de base tigliane et daphnane (*cf.* Figure 2.4).

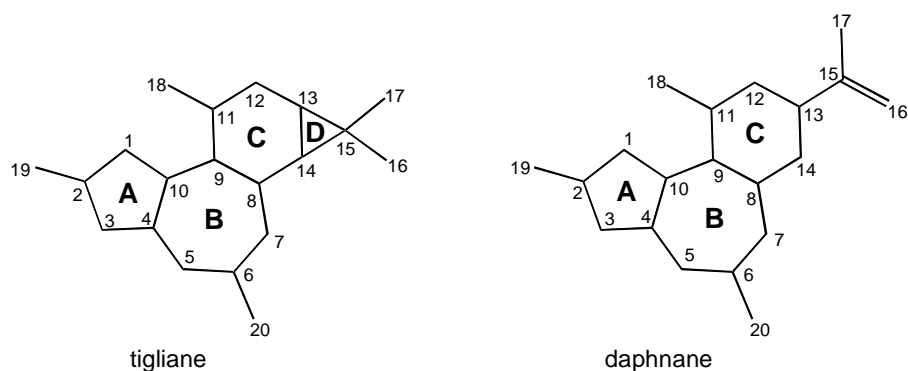
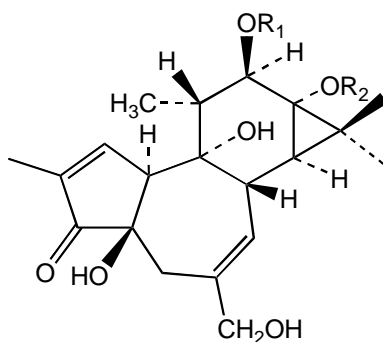


Figure 2.4 – Squelettes de base des diterpènes des Thymelaeaceae.

Tiglanes

Les tiglanes consistent en un groupe de composés tétracycliques qui sont présents dans les plantes sous forme de diterpènes polyhydroxylés acétylés (Evans et Soper, 1978). Il s'agit d'agents toxiques co-cancérigènes et pro-inflammatoires de nombreuses espèces d'Euphorbiaceae, mais on en trouve également parfois chez certaines espèces de Thymelaeaceae. L'isolement et la détermination de structure définitive des 12,13-diester du phorbol (s 1) co-cancérigènes de l'huile de graines de *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae) par Hecker (1968), ont été le point de départ d'une recherche intensive sur les diterpènes pro-inflammatoires et co-cancérigènes des Euphorbiaceae et des Thymelaeaceae.

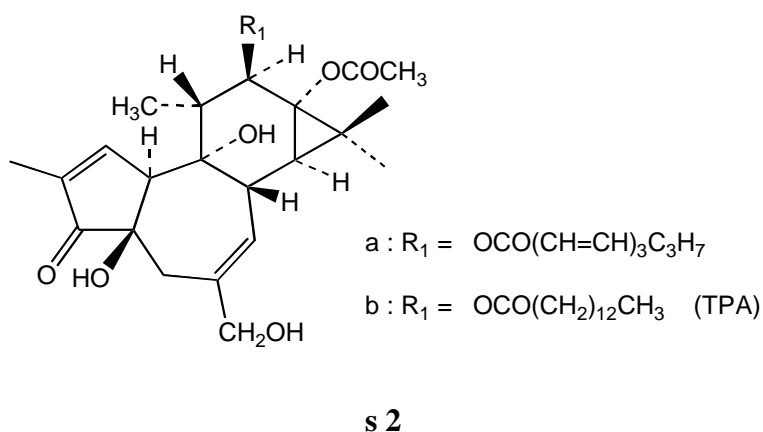


s 1

Le phorbol est présent naturellement sous forme de 12,13-diester ou de 12,13,20-triester du noyau tigliane polyhydroxylé. Ces triester sont des « pro-irritants » (*cryptic irritants*), parce

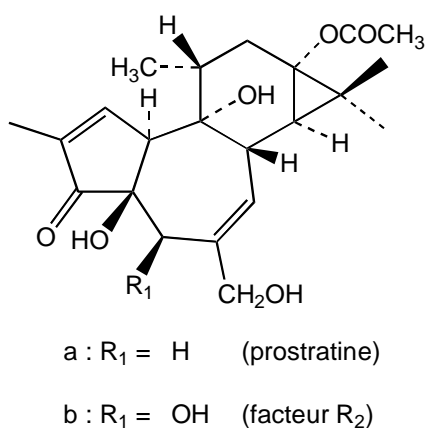
qu'ils ne provoquent pas d'inflammation sur la peau des mammifères à moins que le groupe acyle en C-20 ne soit éliminé par hydrolyse (Hecker, 1971).

De par les propriétés toxicologiques prononcées des 12,13-diesteres du phorbol, leur biochimie a été largement étudiée (Blumberg, 1980-81). Cependant, leur distribution au sein des végétaux supérieurs est limitée à quelques genres de la famille des Euphorbiaceae (*Croton*, *Sapium* et *Euphorbia*) et un seul genre de la famille des Thymelaeaceae (*Aquilaria*). En effet, Gunasekera *et al.* (1981) ont isolé à partir d'*Aquilaria malaccensis* Lamk. (syn. *A. agallocha* Roxb.), le 12-*O*-*n*-déca-2,4,6-triénoylphorbol-13-acétate (**s 2a**), décrit initialement dans *Sapium japonicum* (Sieb et Zucc.) Pax. et Hoffm. (Euphorbiaceae). Ce composé se trouve être très proche du 12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA, **s 2b**), isolé de *Croton tiglium*. Le TPA est l'un des plus puissants inducteurs connus de tumeurs sur la peau de souris et il est utilisé comme précieux outil d'investigation biochimique et pharmacologique (Evans et Soper, 1978 ; Hecker, 1981).

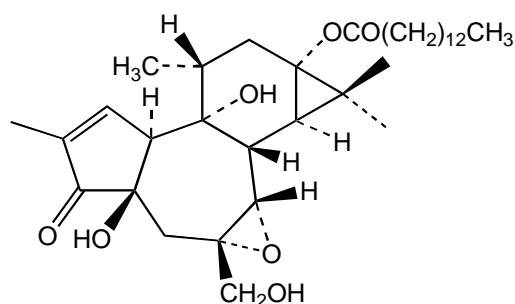


La plupart des autres classes de diterpènes de type tigliane sont également confinées aux Euphorbiaceae, à l'exception de quelques dérivés du 12-désoxyphorbol. Il en est ainsi du 12-désoxyphorbol-13-acétate (prostratine, **s 3a**), un dérivé relativement polaire, qui a été isolé pour la première fois de *Pimelea prostrata* Willd. (Cashmore *et al.*, 1976). Une quinzaine d'années plus tard, Gustafson *et al.* (1992), du National Cancer Institute (NCI) aux Etats-Unis, ont isolé cette même molécule en tant que principe actif d'extraits de *Homalanthus nutans* Guill. (Euphorbiaceae) présentant de puissantes activités antivirales contre le virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1). Il est intéressant de relever que des infusions d'écorce de cette plante étaient utilisées en médecine traditionnelle des Îles Samoa pour

traiter certaines maladies virales, dont l'hépatite (Cox, 1993). Ce sont ces observations sur le terrain qui ont incité l'ethnobotaniste P.A. Cox à proposer cette plante au NCI comme candidat aux tests anti-HIV. En 2001, la prostratine a été brevetée par le NCI et la *AIDS Research Alliance of America* (ARA) compte la développer en tant qu'adjuvant thérapeutique pour éliminer les réservoirs viraux chez les patients à SIDA (*cf.* site web du NCI). L'autre qualité remarquable de cette molécule est qu'elle possède, contrairement à la plupart des autres esters du phorbol, de puissantes propriétés anti-tumorales (Gulakowski *et al.*, 1997 ; Gustafson *et al.*, 1992). Le facteur *Daphnopsis* R₂ (**s 3b**), structuellement très proche, a été isolé de *Daphnopsis racemosa* Griseb. (Adolf et Hecker, 1982) et Zayed *et al.* (1977b) ont isolé de *Pimelea prostrata* le 12-désoxy-5 β -hydroxy-6,7-époxyphorbol-13-tétradécanoate (**s 4**), aussi appelé facteur *Pimelea* P₅. Aucune publication concernant d'éventuelles propriétés anti-HIV de ces deux molécules n'est parue à ce jour.



s 3



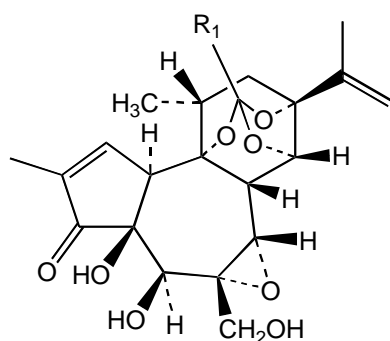
s 4

Daphnanes

Les daphnanes sont des diterpènes tricycliques, présents naturellement sous forme d'orthoesters (Evans et Soper, 1978). En 1970, Stout *et al.* ont isolé un composé hautement toxique, avec un rendement de 0,02 %, à partir d'écorce de « mézéréon » du commerce, qui était en fait un mélange d'écorces de *Daphne mezereum*, *D. laureola* et *D. gnidium*. Ce composé a été appelé daphnétoxine (**s 5a**) et était le premier d'une série d'orthoesters diterpéniques à être isolé des Euphorbiaceae et des Thymelaeaceae.

D'autres orthoesters de type daphnétoxine ont été isolés d'espèces du genre *Pimelea* : la simplexine (facteur *Pimelea* P₁, **s 5b**) de *P. simplex* F. Muell. et *P. prostrata* Willd. (Roberts *et al.*, 1975 ; Zayed *et al.*, 1977b) et le facteur *Pimelea* P₄ (**s 5c**) de *P. prostrata* (Zayed *et al.*, 1977b). Ces deux composés sont soupçonnés d'être les agents causals de l'empoisonnement de bétail connu sous le nom de « maladie de St.-George » (Roberts *et al.*, 1975), qui sera décrit plus en détail dans le chapitre concernant la toxicité des Thymelaeaceae (*cf.* 2.2.5).

Shivanand *et al.* (1983), ont isolé de *Wikstroemia monticola* Skotsberg l'huratoxine (**s 5d**) et l'excoecariatoxine (**s 5e**), diterpènes piscicides précédemment mis en évidence chez des Euphorbiaceae (Sakata *et al.*, 1971a-c ; Ohigashi *et al.*, 1974), ainsi que les wikstrotoxines A-D de structures très proches.

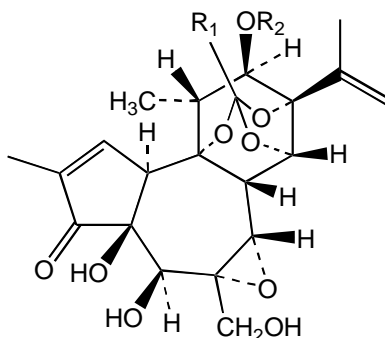


- a : R₁ = C₆H₅ (daphnétoxine)
- b : R₁ = (CH₂)₈CH₃ (simplexin, facteur P₁)
- c : R₁ = (CH₂)₁₂CH₃ (facteur P₄)
- d : R₁ = (CH=CH)₂(CH₂)₈CH₃ (huratoxine)
- e : R₁ = (CH=CH)₂(CH₂)₄CH₃ (excoecariatoxine)

s 5

En 1970, un nouveau composé, la mézéréine (**s 6a**), a été désigné comme le constituant toxique principal des graines de *Daphne mezereum*, dans lesquelles elle est accompagnée de faibles quantités de daphnétoxine (Ronlán et Wickberg, 1970 ; Schildknecht *et al.*, 1970). Le groupe de recherche de Kupchan a isolé une série d'orthoesters antileucémiques de plusieurs espèces de *Gnidia*. Trois d'entre eux, la gnididine (**s 6b**), la gniditrine (**s 6c**) et la gnidicine (**s 6d**), isolés de *G. lamprantha* Gilg sont structurellement proche de la mézéréine et ont montré *in vivo* une activité contre la leucémie à lymphocytes P388 induite chez la souris (Kupchan *et al.*, 1975a).

Deux autres diterpènes antileucémiques, la gnidilatine (**s 6e**) et la gnidilatidine (**s 6f**), isolés de *G. latifolia* Gilg ont un orthoester aliphatique et un ester aromatique en C-12. Leurs esters palmitiques en C-20 ont été isolés de la même plante. Dans le même travail, la gnidiglaucine (**s 6g**), un analogue méthoxylé en C-20, a été isolé de *Gnidia glauca* Gilg (Kupchan *et al.*, 1976b). L'odoracine, isolée de *Daphne odora* Thunb. et présentant des propriétés nématocides (Kogiso *et al.*, 1976), n'est autre que la gnidilatidine ! Un autre diterpène proche, la genkwadaphnine (**s 6h**) isolée de *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc., présente également des propriétés antileucémiques puissantes (Kasai *et al.*, 1981).



a : $R_1 = C_6H_5$	$R_2 = H$	(mézéréine)
b : $R_1 = C_6H_5$	$R_2 = CO(CH=CH)_2(CH_2)_4CH_3$	(gnididine)
c : $R_1 = C_6H_5$	$R_2 = CO(CH=CH)_3(CH_2)_2CH_3$	(gniditrine)
d : $R_1 = C_6H_5$	$R_2 = COCH=CHC_6H_5$	(gnidicine)
e : $R_1 = (CH_2)_8CH_3$	$R_2 = COC_6H_5$	(gnidilatin)
f : $R_1 = (CH=CH)_2(CH_2)_4CH_3$	$R_2 = COC_6H_5$	(gnidilatidine, odoracine)
g : $R_1 = (CH_2)_8CH_3$	$R_2 = COCH_3$	(gnidiglaucine)
h : $R_1 = C_6H_5$	$R_2 = COC_6H_5$	(genkwadaphnine)

s 6

1-Alkyldaphnanes

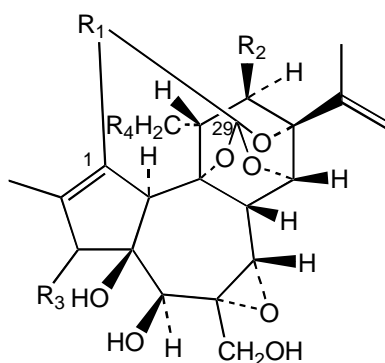
Les 1-alkyldaphnanes sont un groupe d'esters diterpéniques qui ne se retrouvent que dans la famille des Thymelaeaceae. Ils ont une structure proche de la daphnétoxine, mais l'un des atomes de carbone de la chaîne aliphatique orthoestérique est attaché en C-1, formant ainsi un macrocycle (C-21 à C-28). De plus, la double liaison 1-2 est absente et la cétone en C-3 est parfois remplacée par un ester benzoïque (Evans et Taylor, 1982).

La gnidimacrine (**s 7a**) a été le premier composé de cette catégorie à être isolé, à partir de *Gnidia subcordata* Meissn. Dans la plante, elle est accompagnée de son ester 20-*O*-palmitique et les deux substances ont une puissante activité anti-leucémique *in vivo* (Kupchan *et al.*, 1976a). La plupart des 1-alkyldaphnanes ont été isolés à partir d'espèces du genre *Pimelea*. Le facteur *Pimelea* P₂ (**s 7b**), de *P. prostrata*, possède un groupe benzoyle secondaire en C-3 et un orthoester aliphatique à 7 carbones attaché en C-1 (Zayed *et al.*, 1977a). On le retrouve également sous l'appellation de facteur *Daphnopsis* R₁, isolé de *Daphnopsis* spp. (Zayed *et al.*, 1977a), et de linifoline b, isolée de *P. ligustrina* Labill. et *P. linifolia* Sm. (Tyler et Howden, 1981).

La linifoline a (**s 7c**), composé antinéoplasique et piscicide tiré de *P. linifolia*, diffère de par la présence d'un acétate en C-12, ce qui la rapproche des dérivés de la 12-hydroxydaphnétoxine (Tyler et Howden, 1981). Quatre ans plus tard, les mêmes chercheurs ont décidé de rebaptiser la linifoline a en linimacrine a pour marquer cette différence et ont isolé à partir de *P. linifolia* les linimacrine c (**s 7d**) et d (épimère de la linimacrine a en C-21), ainsi que la simpleximacrine (**s 7e**) de *P. simplex*. Alors que la gnidimacrine, la simpleximacrine, la linimacrine d et le facteur *Pimelea* P₃ présentent une activité antinéoplasique *in vivo* chez la souris, la linimacrine c et les quatre substances précitées ont toutes une activité piscicide dans les tests sur le poisson *Gambusia affinis* (Tyler et Howden, 1985).

Zayed *et al.* (1982) ont isolé de *P. prostrata* le facteur *Pimelea* P₃, épimère du facteur *Pimelea* P₂ en position C-21. Borris et Cordell (1984) ont de leur côté isolé un épimère en C-21 de la linimacrine c à partir de *Gnidia kraussiana* Meissn. : la kraussianine. Parmi les autres 1-alkyldaphnanes d'intérêt isolés, mentionnons encore certaines ayant conservé la lactone α,β -insaturée du noyau daphnane : le facteur *Pimelea* S₇ (**s 7f**) de *P. simplex*, le facteur *Pimelea* P₆ (**s 7g**) de *P. prostrata* et le facteur *Synaptolepis* K₁ (**s 7h**) de *Synaptolepis* spp. (Zayed *et al.*, 1977a).

Finalement, pour se convaincre de la diversité structurale des diterpènes, on se référera à l'étude des racines de *Synaptolepis kirkii* (Oliver) Gilg et *S. retusa* H.H.W. Pearson par Adolf *et al.* (1988), dans laquelle pas moins de 17 esters diterpéniques de type daphnane et 1-alkyldaphnane, la plupart nouveaux, ont été isolés !



a : R ₁ = (C-1)-(CH ₂) ₇ C _R H(OH)	R ₂ = H	R ₃ = OCOC ₆ H ₅	R ₄ = OCOC ₆ H ₅	(gnidimacrine)
b : R ₁ = (C-1)-C ₃ H(CH ₃)(CH ₂) ₇	R ₂ = H	R ₃ = OCOC ₆ H ₅	R ₄ = H	(facteur P ₂ /R ₁ , linifoline b)
c : R ₁ = (C-1)-C ₃ H(CH ₃)(CH ₂) ₇	R ₂ = OCOCH ₃	R ₃ = OCOC ₆ H ₅	R ₄ = H	(linimacrine a, linifoline a)
d : R ₁ = (C-1)-C ₃ H(CH ₃)(CH ₂) ₆ C _R H(OH)	R ₂ = H	R ₃ = OCOC ₆ H ₅	R ₄ = H	(linimacrine c)
e : R ₁ = (C-1)-(CH ₂) ₇ CH(OH)	R ₂ = H	R ₃ , R ₄ = OCOC ₆ H ₅ , OCOC ₆ H ₅ OCOCH ₃		
(simpleximacrine)				
f : R ₁ = (C-1)-CH(CH ₃)(CH ₂) ₇	R ₂ = H	R ₃ = =O	R ₄ = H	(facteur S ₇)
g : R ₁ = (C-1)-CH(CH ₃)(CH ₂) ₆ CH(OCOC ₆ H ₅)	R ₂ = H	R ₃ = =O	R ₄ = H	(facteur P ₆)
h : R ₁ = (C-1)-(CH ₂) ₁₃ CH=CH	R ₂ = H	R ₃ = =O	R ₄ = H	(facteur K ₁)

s 7

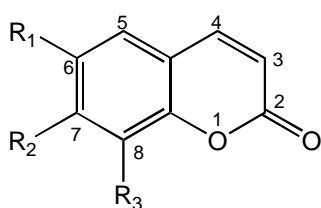
2.2.3.3 Coumarines

Les coumarines sont une autre classe de métabolites secondaires des Thymelaeaceae intéressante du point de vue taxonomique. Dans cette famille, on les trouve sous forme de coumarines simples, de di- et trimères de coumarines avec liaison C-C ou éther ou à structure dibenzofuranique, ou de coumarinolignanes.

Parmi les coumarines simples caractéristiques des Thymelaeaceae, on trouve la daphnéine (s 8a ; Ergenç, 1968) et ses dérivés 7- β -D-glucoside (daphnine ; Nakabayashi, 1954) et 8- β -D-glucoside (Kosheleva et Nikonov, 1968). Bien qu'ils aient été isolés initialement de différentes espèces de *Daphne*, on en retrouve également dans de nombreux autres genres de

la famille dont *Ovidia*, *Thymelea* et *Wikstroemia* (Borris *et al.*, 1988). Bhandari *et al.* (1981) ont isolé de *Lasiosiphon eriocephalus* Decne, une coumarine glucosylée de structure proche : l'érioside (**s 8b**). Zhuang *et al.* (1982) ont décrit dans *Daphne tangutica* Maxim., un arbuste ornemental de Chine, la 8-méthoxydaphnéatine (hydrangetine). D'un autre arbuste chinois, *Daphne giraldi* Nitsche, Wang et Gaugaz (1980) ont isolé les 7-méthoxy et 7,8-diméthoxydaphnéatines.

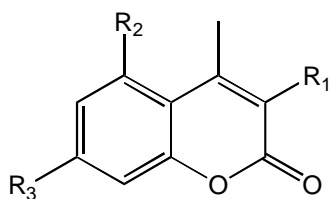
L'étude de *Thymelaea hirsuta* Endl. par Rizk *et al.* (1975) a permis de mettre en évidence des coumarines très répandues chez les végétaux supérieurs : l'esculétine (**s 8c**), la scopolétine (**s 8d**) et l'ombelliférone (**s 8e**).



a : R ₁ = H	R ₂ = OH	R ₃ = OH	(daphnéatine)
b : R ₁ = OH	R ₂ = O-Glc	R ₃ = OH	(érioside)
c : R ₁ = OH	R ₂ = OH	R ₃ = H	(esculétine)
d : R ₁ = OCH ₃	R ₂ = OH	R ₃ = H	(scopolétol)
e : R ₁ = H	R ₂ = OH	R ₃ = H	(ombelliférone)

s 8

Chatterjee *et al.* (1987) ont isolé deux nouvelles 4-méthylcoumarines de l'écorce du tronc d'*Edgeworthia gardneri* Meissn. : les *Edgeworthia gardneri*-coumarines A et B (**s 9a-b**).

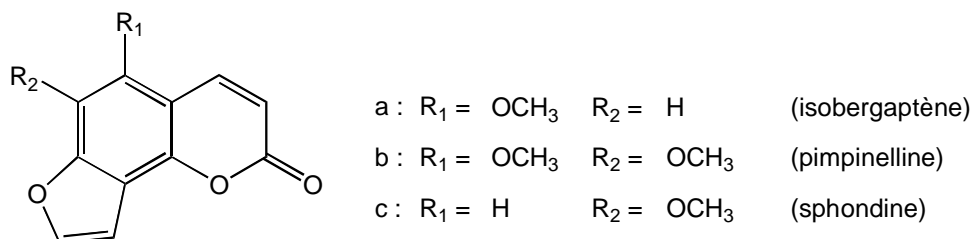


a : R ₁ = CH ₃	R ₂ = H	R ₃ = OC ₂ H ₅	(<i>E.g.</i> -coum. A)
b : R ₁ = H	R ₂ = OCH ₃	R ₃ = H	(<i>E.g.</i> -coum. B)

s 9

Dans *Stellera chamaejasme* L., Tikhomirova *et al.* (1974) ont mis en évidence deux furanocoumarines angulaires connues, l'isobergaptène (**s 10a**) et la pimpinelline (**s 10b**). Un composé du même type, la sphondine (**s 10c**), a été isolé de *Thymelaea passerina* (George et Rishi, 1982). Rappelons ici que les furanocoumarines sont des molécules phototoxiques en ce qu'elles provoquent des dermatites de contact à vésicules, suivies d'hyperpigmentation, sous

l'action de la lumière du soleil. Notons cependant que les furanocoumarines angulaires ne sont que faiblement phototoxiques en comparaison des furanocoumarines linéaires (Bruneton, 1999). Comme *T. passerina* (passerine annuelle) est un sous-arbrisseau très menacé chez nous, ce qui précède donne une raison de plus de ne pas y toucher !



s 10

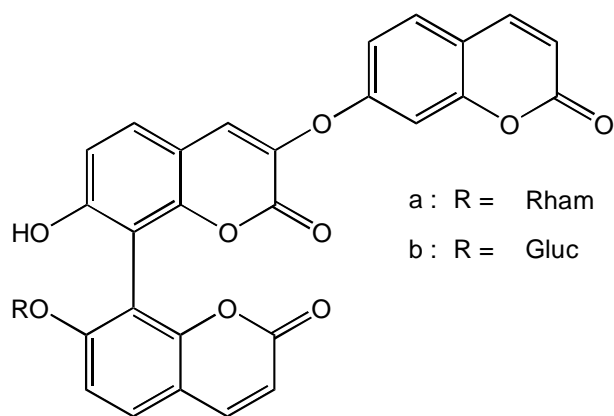
Alors que les coumarines sont largement répandues dans la nature, avec plus de 1000 représentants, moins d'une quarantaine de bicoumarines ont été répertoriées à ce jour, principalement chez certaines Fabaceae, Rutaceae et Thymelaeaceae (Basa, 1988). Leur présence dans la famille des Thymelaeaceae en fait donc un marqueur chimiotaxonomique de valeur !

Historiquement, la première bicoumarine des Thymelaeaceae est la daphnorétine (**s 11a**), un 3,7'-dicoumarylester isolé en 1963 à raison de 0,08 % en poids sec des baies de *Daphne mezereum* et des feuilles de *Daphnopsis racemosa*. L'écorce de mézéréon n'en contient par contre qu'en traces (Tschesche *et al.*, 1963a). Le même groupe de chercheurs a isolé le 6-glucoside de la daphnorétine, appelé daphnorine (**s 11b**), de *Daphne mezereum* (Tschesche *et al.*, 1963b). L'edgeworthine (**s 11c**), un dérivé proche, a été mise en évidence dans l'écorce du tronc d'*Edgeworthia gardneri* (Majumder *et al.*, 1974). De la même plante, Chakrabarti *et al.* (1986) ont isolé l'acétyldaphnorétine (**s 11d**), alors que Ulubelen *et al.* (1986) ont identifié la diméthyldaphnorétine (**s 11e**) extraite de *Daphne gnidioides* Szovits ex Meissn. *Edgeworthia chrysantha* Lindl. a également fourni deux nouveaux 3,7'-dicoumaryléthers : l'edgeworine (**s 11f**) et la rutarensine (**s 11g**) (Baba *et al.*, 1989 et 1990)

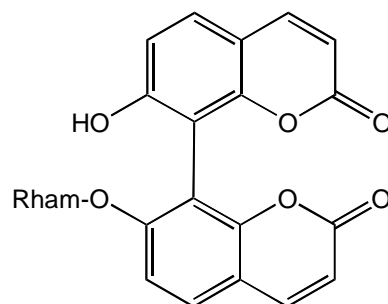


s 12

30

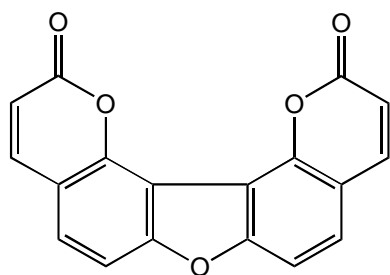


s 13

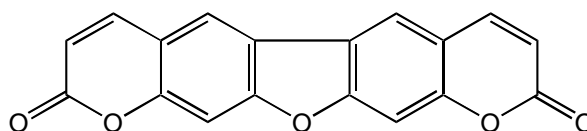


s 14

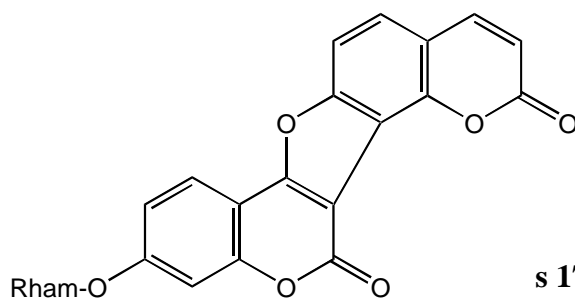
Des bicoumarines à structure dibenzofuranique ont également été mises en évidence chez les Thymelaeaceae. Ainsi, Kupchan *et al.* (1975b) ont isolé de *Gnidia lamprantha* la gnidicoumarine (**s 15**). De *Lasiosiphon eriocephalus*, deux molécules similaires ont été isolées : la lasioérine (**s 16**) par Sengupta et Das (1978) et l'ériocéphaloside (**s 17**) par Bhandari et Rastogi (1981).



s 15



s 16

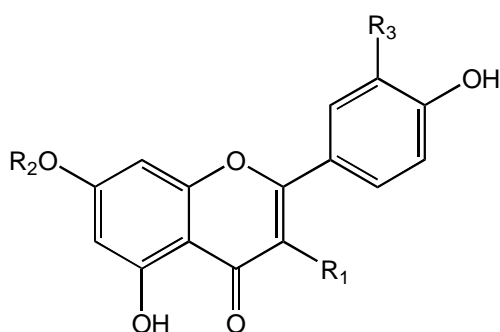


s 17

2.2.3.4 Flavonoïdes

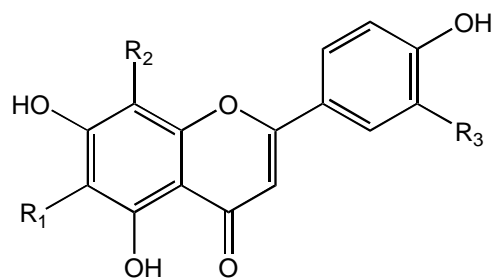
Une caractéristique frappante des Thymelaeaceae est la diversité de leur métabolisme flavonoïdique. On y rencontre en effet aussi bien des flavones, des flavonols, des flavanones, des C-glycosylflavones, que des biflavonoïdes. On relèvera en particulier la présence de flavones lipophiles peu oxygénés ou méthylés et de différents types de biflavonoïdes (spirobiflavonoïdes, furanobiflavonoïdes, etc.). Cette dernière classe, autrefois considérée comme une caractéristique des Gymnospermae et des Clusiaceae, s'avère aujourd'hui être répandue chez de nombreux végétaux, y compris les Bryophytae (Hegnauer, 1990). Seuls quelques exemples de structures représentatives sont présentés ici.

Les flavonoïdes les plus courants chez les Thymelaeaceae sont les dérivés O-glycosylés et méthylés de l'apigénine, de la genkwanine, du kaempférol et de la lutéoline (**s 18a-d**). Les C-glycosylflavones orientine, vitexine et isovitexine (**s 19a-c**) ont également été mises en évidence chez certaines *Daphne* et *Thymelaea* (Borris *et al.*, 1988).



- a : R₁ = H R₂ = H R₃ = H (apigénine)
 b : R₁ = H R₂ = CH₃ R₃ = H (genkwanine)
 c : R₁ = OH R₂ = H R₃ = H (kaempférol)
 d : R₁ = H R₂ = H R₃ = OH (lutéoline)

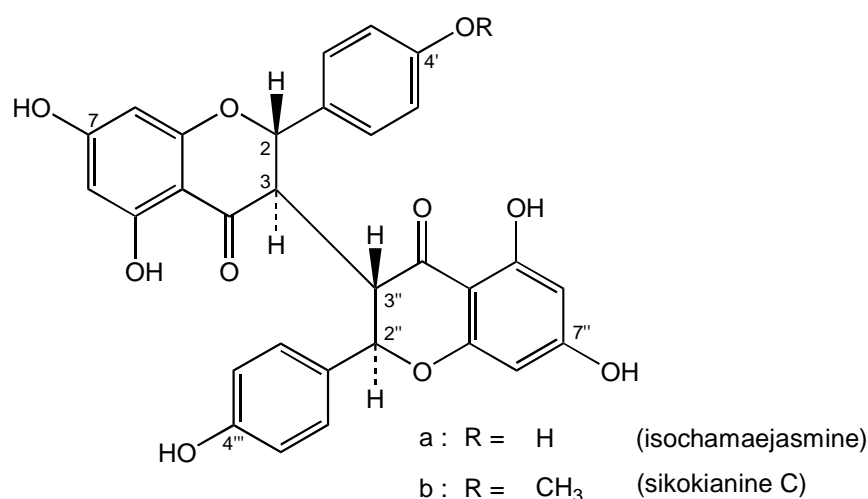
s 18



- a : R₁ = Glc R₂ = H R₃ = OH (orientine)
 b : R₁ = H R₂ = Glc R₃ = H (vitexine)
 c : R₁ = Glc R₂ = H R₃ = H (isovitexine)

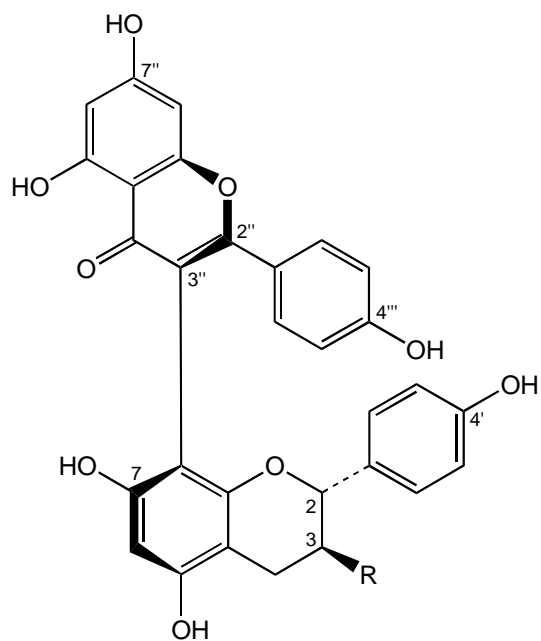
s 19

Des racines de *Stellera chamaejasme* L. récoltées en Chine ont fourni une série de 3,3''-binaringénines : les stéréoisomères chamaejasmine, isochamaejasmine (**s 20a**) et néochamaejasmines A et B (Niwa *et al.*, 1986b), des dérivés diméthyléther (C-4',-4'''), les chamaejasménines A et B, et triméthyléther (C-7,-4',-4'''), la chamaejasménine C (Liu *et al.*, 1984). Des précurseurs biosynthétiques des chamaejasménines méthylés en C-4' ou C-4''', les sikokianines A et B, ont été isolés de *Wikstroemia sikokiana* Franch. et Sav. par Niwa *et al.* (1986a). Baba *et al.* (1994) ont isolé de la même plante la sikokianine C (**s 20b**) et les atropisomères wikstrols A et B (**s 21c-d**), dérivés hydroxylés des atropisomères daphnodorines D₁ et D₂ (**s 21a-b**) respectivement, isolés précédemment dans *Daphne odora* (Baba *et al.*, 1987). Ces derniers produits naturels sont des 3,8''-biflavonoïdes proches de la série des GB (*Garcinia Biflavonoids*), qui ont été isolés de plusieurs espèces de *Garcinia* (à l'origine, d'où leur nom), *Rheedia* et *Allanblackia* (Clusiaceae) et possèdent d'intéressantes propriétés analgésiques (Bittar *et al.*, 2000 ; Luzzi *et al.*, 1997).

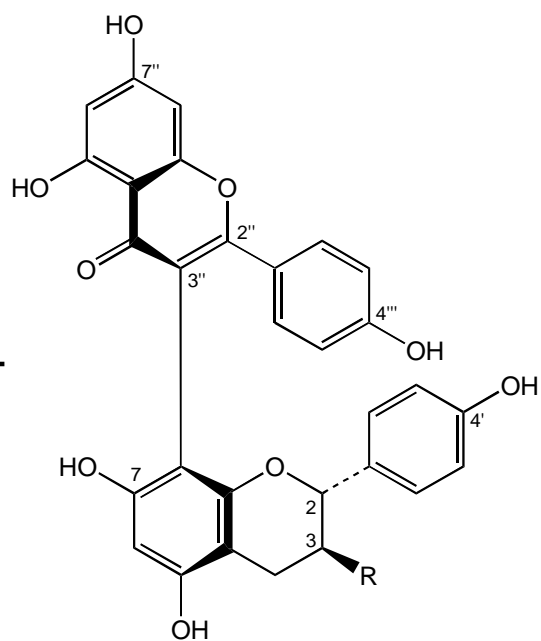


s 20

Plusieurs études relativement récentes sur *Daphne odora* Thunb. (Baba *et al.*, 1985 et 1995 ; Taniguchi et Baba, 1996 ; Taniguchi *et al.*, 1997), *D. genkwa* Sieb. et Zucc. (Baba *et al.*, 1992, 1993) et *D. acutiloba* Rehd. (Taniguchi *et al.*, 1998) ont permis l'isolement de nombreux spiro- et furanobiflavonoïdes, dont les daphnodorines A-C et E-N et les genkwanols A-C. Quelques formules caractéristiques sont représentées ci-après (**s 22-s 25**), sachant que les autres composés isolés en sont des isomères

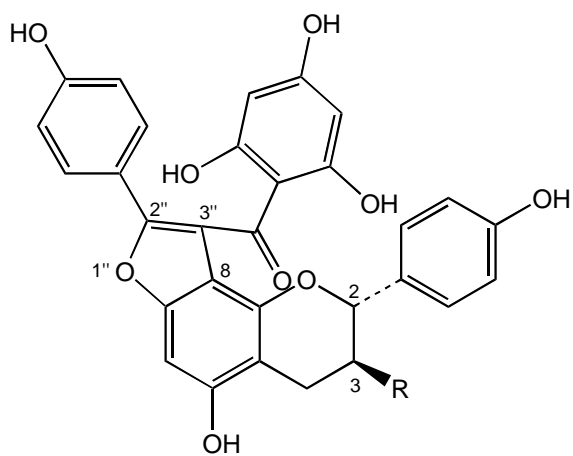


a : R = H (daphnodorine D₁)
c : R = OH (wikstrol A)

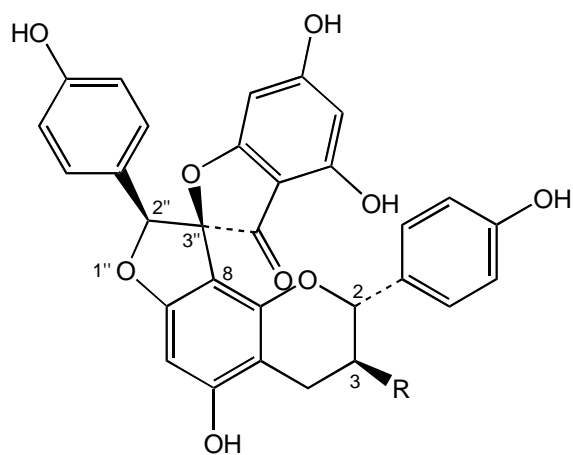


b : R = H (daphnodorine D₂)
d : R = OH (wikstrol B)

s 21



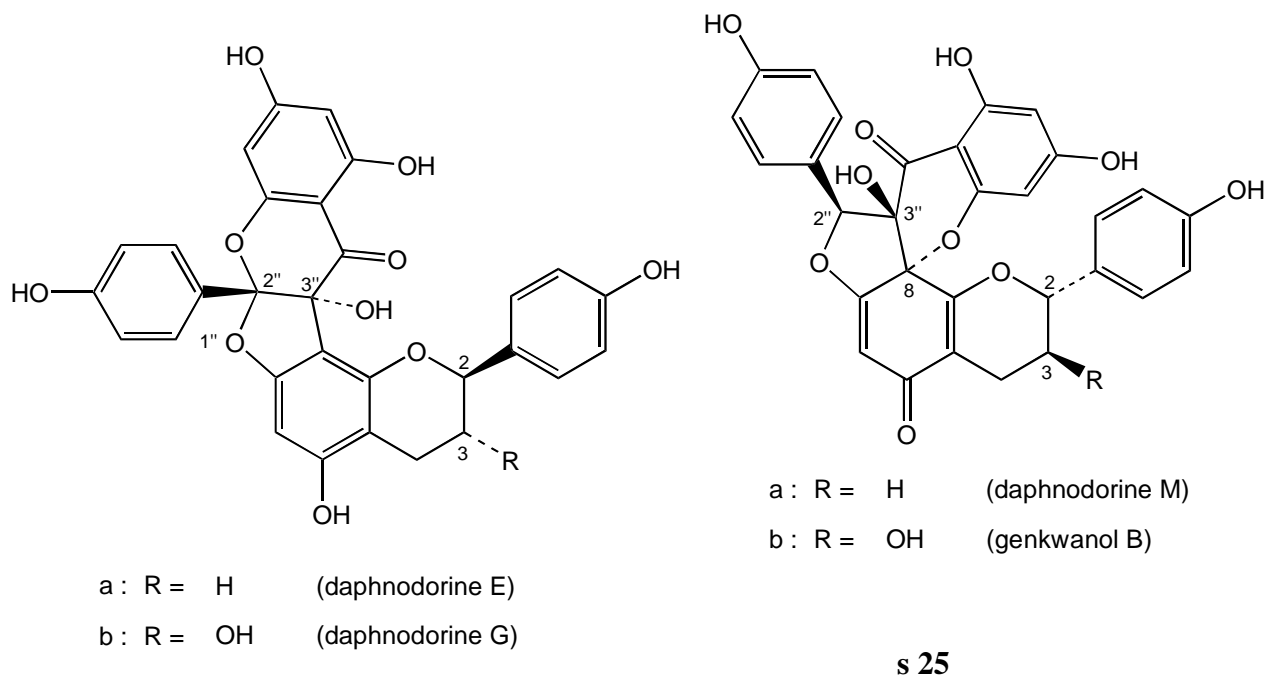
a : R = H (daphnodorine A)
b : R = OH (daphnodorine B)



a : R = H (daphnodorine C)
b : R = OH (daphnodorine I)

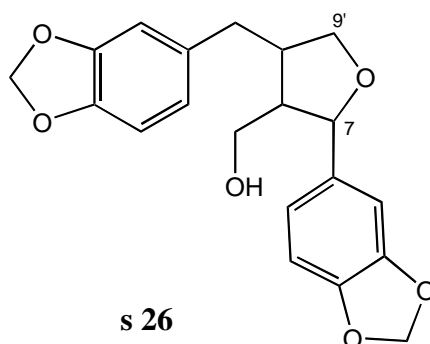
s 22

s 23

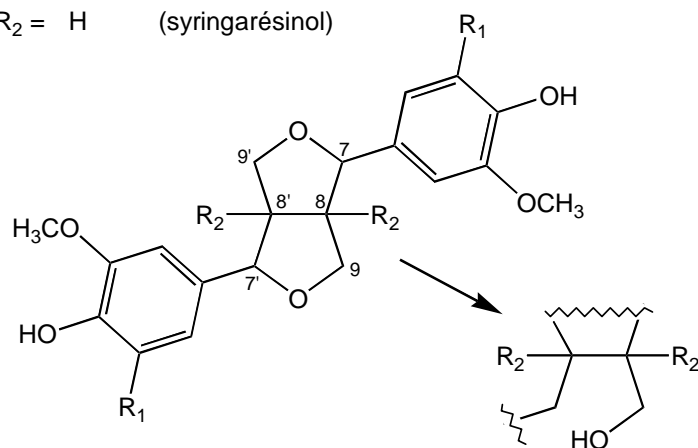


2.2.3.5 Lignanes et composés apparentés

Les lignanes, produits de condensation de deux unités phénylpropaniques, jouent sans doute un rôle important pour la défense des végétaux. En effet, des propriétés antibactériennes, antifongiques et antinutritives ont été décrites pour de nombreuses molécules de ce groupe (Bruneton, 1999). Dans leur étude de *Daphne tangutica*, Zhuang *et al.* (1982) ont mis en évidence des lignanes monofuraniques (dihydrosésamine ; **s 26**), furanofuraniques (pinorésinol, syringarésinol et laricirésinol ; **s 27a-c**) et le coumarinolignane daphnéticine (**s 30b**).



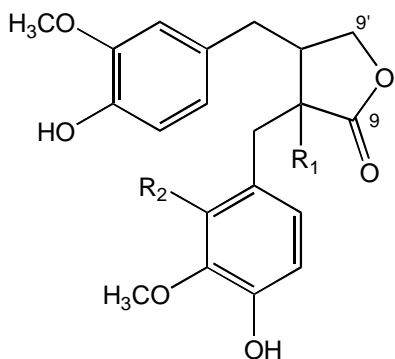
- a : $R_1 = H$ $R_2 = CH_3$ (pinorésinol)
 b : $R_1 = OCH_3$ $R_2 = H$ (syringarésinol)



- c : $R_1 = H$ $R_2 = CH_3$ (laricirésinol)

s 27

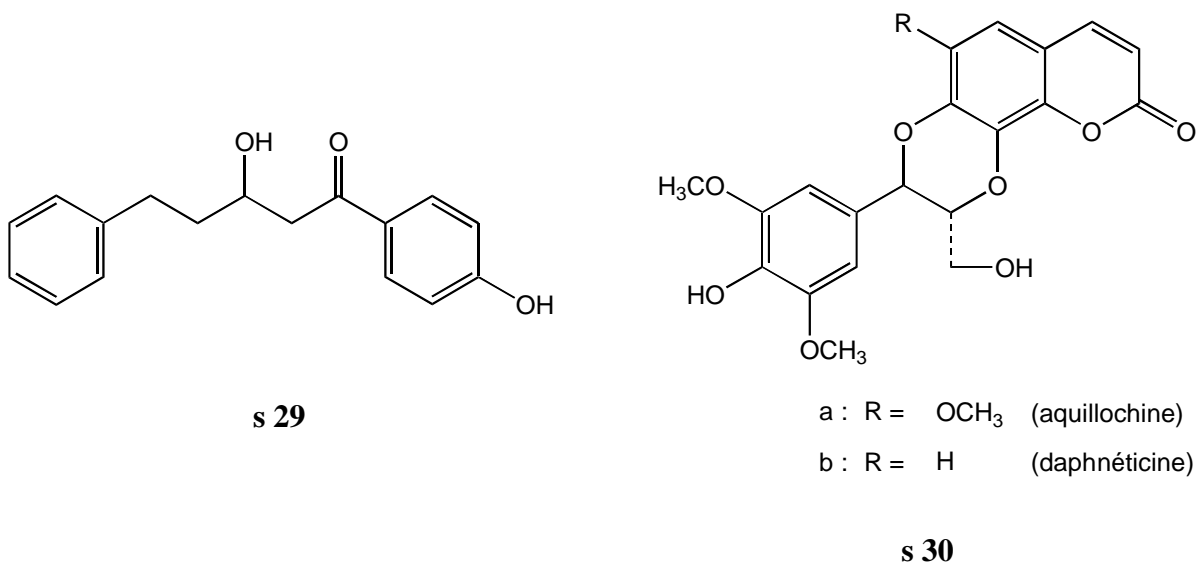
L'étude du bois et de l'écorce de la tige de *Gnidia latifolia* Gilg a permis de mettre en évidence la gnidifoline (s **28a**), un lignane butyrolactonique (Bryan et Shen, 1978). Tandon *et al.* (1976) et Torrance *et al.* (1979) ont isolé de différentes espèces de *Wikstroemia* le lignane cytotoxique wikstromol (s **28b**), de structure similaire. Des racines de *Stellera chamaejasme* L., Tatematsu *et al.* (1984) ont isolé, outre le pinorésinol à propriétés piscicides, le lignane butyrolactonique matairésinol (s **28c**). On relèvera l'analogie structurale des trois lignanes précédents avec la podophyllotoxine tirée de *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae), dont les dérivés hémisynthétiques antinéoplasiques téniposide et étoposide sont utilisés en thérapie anticancéreuse.



- a : $R_1 = H$ $R_2 = OH$ (gnidifoline)
 b : $R_1 = OH$ $R_2 = H$ (wikstromol)
 c : $R_1 = H$ $R_2 = H$ (matairésinol)

s 28

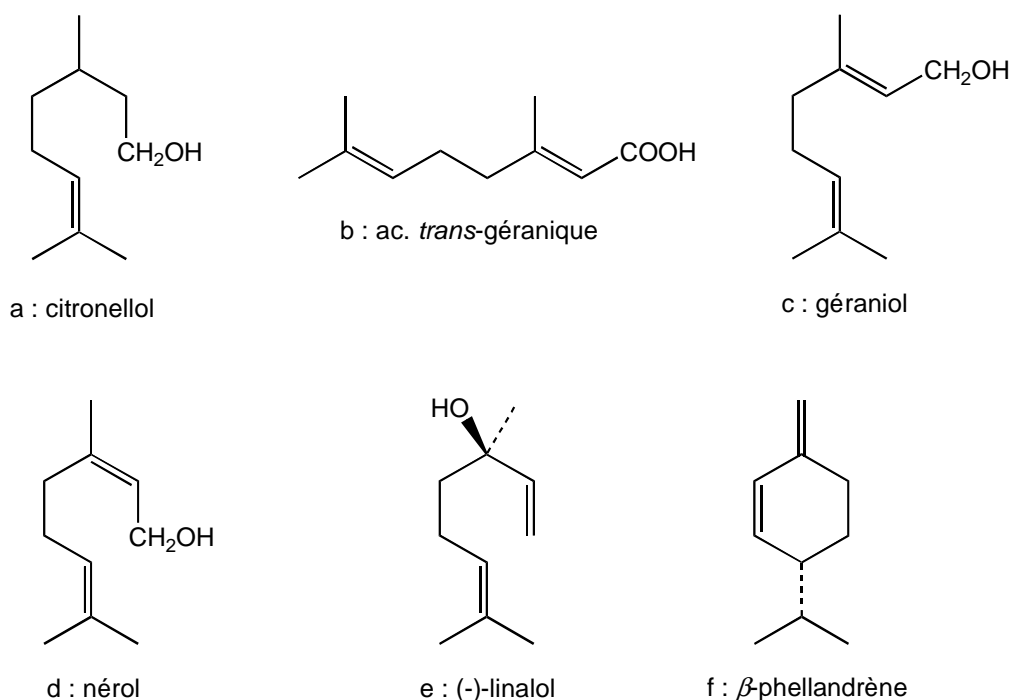
Panizo *et al.* (1972) ont décrit dans les racines de *Daphne gnidium* L. (« torvisco » en espagnol) le torviscol (**s 29**), un nornéolignane. Cette dernière classe est surtout rencontrée chez les Gymnospermae. Finalement, deux coumarinolignanes ont été isolés de Thymelaeaceae : l'aquillochine (**s 30a**) du tronc sain d'*Aquilaria agallocha* (Bhandari *et al.*, 1982) et la daphnéticine (**s 30b**) de différentes espèces de *Daphne* (Zhuang *et al.*, 1982 ; Baba *et al.*, 1986).



2.2.3.6 Huiles essentielles

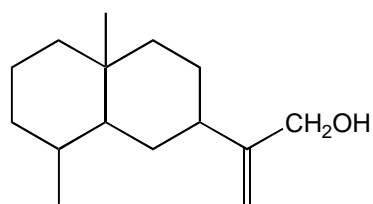
Les Thymelaeaceae ne sont pas à proprement parler des plantes à huiles essentielles, car elles ne possèdent pas de poches excrétrices. Cependant, de nombreux genres produisent des fleurs odorantes (*Daphne*, *Dais*, *Dirca*, *Pimelea*, etc.) et quelques Thymelaeaceae arborescentes d'Asie fournissent des bois odorants (« bois d'agar », « bois d'aigle », « bois d'aloès », « agaru », « jinkoh », etc.), qui sont riches en résine et en huile essentielle.

Les études les plus représentatives sur une Thymelaeaceae à fleurs parfumées sont celles qui ont été menées, par Sisido *et al.* (1967) et Watanabe *et al.* (1983), sur les fleurs de *Daphne odora* Thunb., un arbuste ornemental prisé au Japon. Ces travaux ont permis de mettre en évidence de nombreux monoterpènes volatils, parmi lesquels le citronellol, l'acide *trans*-gérannique, le géraniol, le (-)-linalol, le nérol et le β -phellandrène (**s 31a-f**).

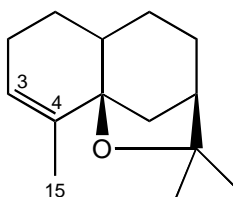


s 31

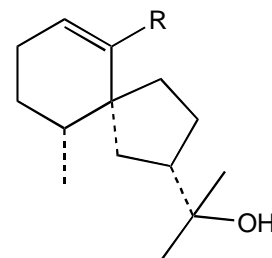
Les bois odorants sont originaires d'Indonésie et proviennent de *Wikstroemia tenuiramis* Miq., *Aquilaria malaccensis* Lamk. et *Gonystylus macrophyllus* (Miq.) Airy Shaw. Le « bois d'agar » le plus réputé est cependant tiré d'*Aquilaria agallocha* Roxb., une Thymelaeaceae arborescente d'Inde, que certains auteurs considèrent comme identique à *A. malaccensis*. Seuls les arbres vieux et infectés par certains champignons pathogènes fournissent un bois de cœur brun-noir, riche en résine et en huile essentielle, qui peut être utilisé pour la fabrication de parfums et de bâtons d'encens en Inde, au Pakistan, en Indonésie et en Asie du Sud-Est. Au Pakistan, *Cytosphaera mangiferae* a été désigné comme l'un des champignons responsables de l'infection des arbres fournissant du bois odorant. Comme les constituants des « bois d'agar » ont une origine pathologique, leur pertinence chimiotaxonomique est réduite. Alors que le bois sain d'*A. agallocha* ne produit qu'env. 0,08 % d'huile essentielle, le bois infecté produit env. 0,4 % d'une huile essentielle riche en sesquiterpènes oxygénés (Hegnauer, 1973 et 1990). Comme le montre l'étude de Yoneda *et al.* (1986) sur *A. agallocha* et *A. malaccensis*, le composant majoritaire est l'agarol, accompagné de plus faibles quantités d' α - et de β -agarofurane, d'agarospirol et d'oxoagarospirol, de jinkho-éremol et de kusunol, des jinkohols I et II et de 10-épi- γ -eudesmol (s 32a-j).



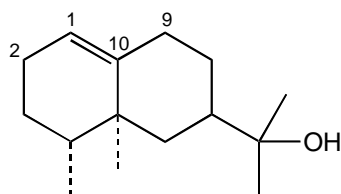
a : agarol



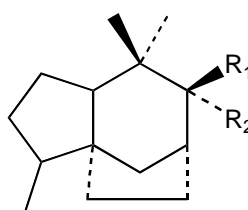
b : α -agarofurane
c : β -agarofurane
($\Delta^{4,15}$ au lieu de $\Delta^{3,4}$)



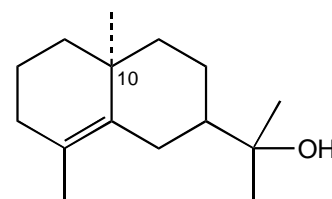
d : R = CH₃ (agarospirol)
e : R = COH (oxoagarospirol)



f : kusunol
g : jinkoh-éremol
($\Delta^{9,10}$ au lieu de $\Delta^{1,10}$)



h : R₁ = OH R₂ = CH₃ (jinkohol I)
i : R₁ = H R₂ = CH₂OH (jinkohol II)



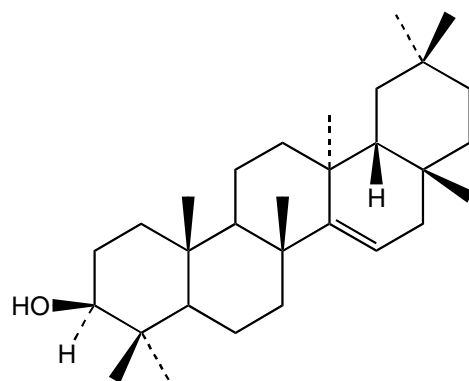
j : 10-épi- γ -eudesmol

s 32

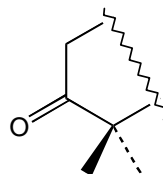
2.2.3.7 Divers

Les stérols sont courants chez les Thymelaeaceae, principalement représentés par le β -sitostérol, qui est ubiquitaire dans le règne végétal (Borris *et al.*, 1988). A titre de curiosité, citons ici le travail de García-Granados et Sáenz de Buruaga (1980b), qui leur a permis d'isoler le cholestérol, stérol caractéristique des vertébrés supérieurs, à partir des feuilles de *Thymelea hirsuta* L. !

Quelques triterpènes ont été mis en évidence dans la famille. Ainsi, Maiti *et al.* (1963 et 1967) ont isolé des feuilles de *Daphne cannabina* Wall. le taraxérol (s 33a) et la taraxérone (s 33b), triterpènes pentacycliques originellement identifiés chez le pissenlit (*Taraxacum officinale* L., Asteraceae).



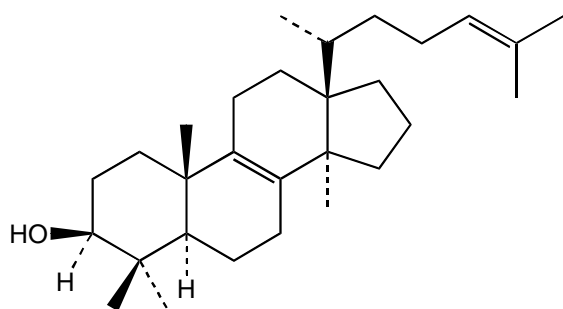
a : taraxérol



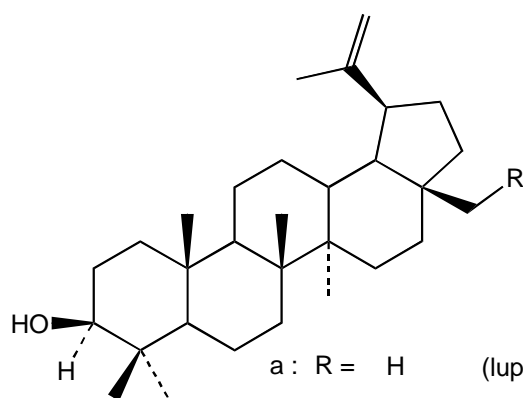
b : taraxénone

s 33

A partir des feuilles de *Thymelea hirsuta* L., García-Granados et Sáenz de Buruaga (1980b) ont isolé des triterpènes de type dammarane (lanostérol ; s 34), lupane (lupéol et bétuline ; s 35a et b) et oléanane (β -amyrine et érythrodiol ; s 36a et b).



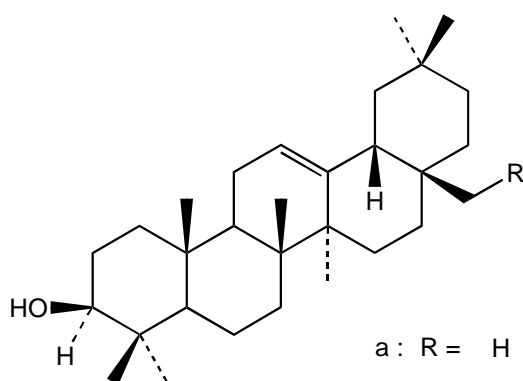
s 34



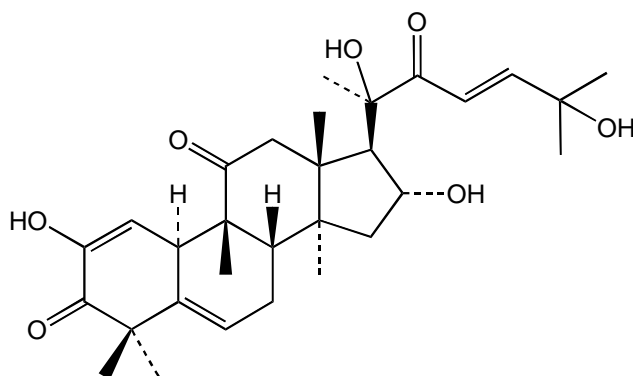
a : R = H (lupéol)
b : R = OH (bétuline)

s 35

s 36

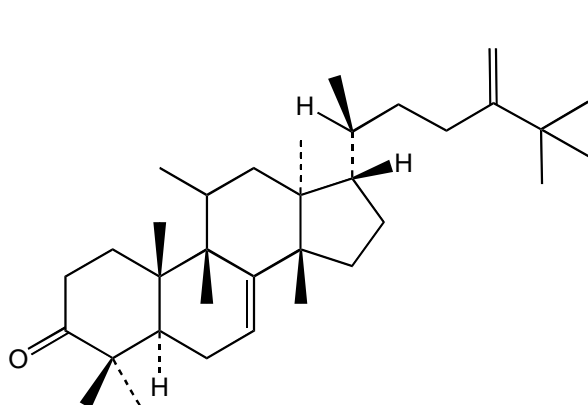


a : R = H (β -amyrine)
b : R = OH (érythrodiol)

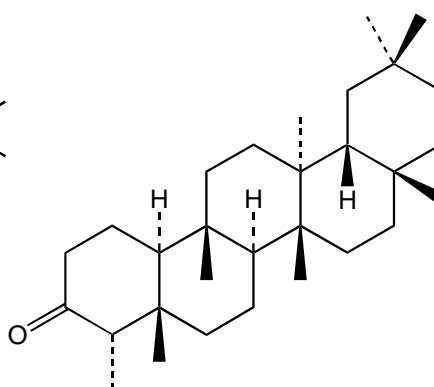


s 37

Les études des feuilles et des rameaux de *Gyrinops walla* Gaertn. par Shun et Cordell (1985) et Shun *et al.* (1986) ont permis l'isolement de la cucurbitacine I (s 37), triterpène tétracyclique à propriétés antitumorales, de la wallénone de structure proche (s 38) et de deux triterpènes de type friedelane (friedeline et son dérivé 3 β -OH ; s 39).

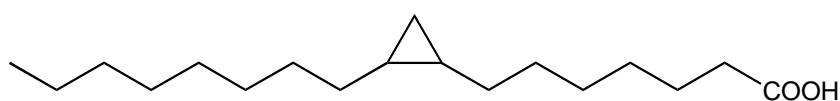


s 38



s 39

Parmi les acides gras produits par les Thymelaeaceae, on retrouve des acides cyclopropaniques, qui tendraient à confirmer l'appartenance de la famille à l'ordre des Malvales (Alverson *et al.*, 1998). A titre d'exemple, citons l'étude de Vickery (1981), qui a mis en évidence l'acide dihydromalvalique (s 40) dans plusieurs espèces de *Pimelea*.



s 40

Les alcaloïdes sont pratiquement absents des Thymelaeaceae. Les seules données scientifiques disponibles font état de leur présence, sans jamais les identifier, dans les graines de *Daphne mezereum*, dans une espèce de *Lasiosiphon* de Madagascar (0,06 % A.T.) et dans deux espèces de *Phaleria* d'Indonésie. Les saponines semblent également peu courantes dans la famille. Des anciens travaux en évoquent dans *Dirca palustris* L. et dans une espèce de *Lasiosiphon* (Hegnauer, 1973). Ces résultats n'ont jamais été confirmés depuis l'avènement de méthodes d'analyse *on-line* et on peut donc affirmer que les Thymelaeaceae ne sont pas une famille à alcaloïdes ni à saponines.

Quant aux tanins, ils semblent être peu courants dans la famille. Lorsqu'ils apparaissent, il s'agit généralement de dérivés du leucocyanidol (Hegnauer, 1973).

2.2.4 Considérations chimiotaxonomiques

Les esters diterpéniques de type daphnane et tiglane, les mono-, di- et trimères coumariniques et les lignanes sont très répandus chez les Thymelaeaceae. La diversité des métabolismes des flavonoïdes et des triterpènes est également remarquable. De par son métabolisme secondaire, la famille rappelle donc fortement les Euphorbiaceae, bien que les tanins galliques et ellagiques soient plus rares chez les Thymelaeaceae. Du point de vue taxonomique, il est également intéressant d'observer la présence d'autres molécules rares dans le règne végétal : les cucurbitacines (triterpènes tétracycliques cytotoxiques des Cucurbitaceae) et du lanostérol (triterpène tétracyclique présent dans certains latex d'Euphorbiaceae et chez des levures) (Hegnauer, 1990).

Lorsqu'on considère les métabolites secondaires identifiés chez les Thymelaeaceae du point de vue taxonomique, il ne faut pas oublier que de nombreux composés ont été obtenus à partir des fractions cytotoxiques des plantes étudiées. Comme des quantités très importantes de matériel ont été extraites dans cette approche prometteuse, il a dès lors même été possible d'isoler et de caractériser des métabolites présents en traces (Hegnauer, 1990) !

2.2.5 Toxicité des *Thymelaeaceae*

La toxicité des *Thymelaeaceae* est bien établie pour les êtres humains, aussi bien que pour de nombreuses espèces animales. En effet, les diterpènes de type tigliane et daphnane sont des purgatifs violents qui déclenchent, par contact avec la peau ou les muqueuses, une réaction inflammatoire intense (Brooks et Evans, 1990). Les manifestations toxiques peuvent être séparées en deux catégories, selon que le matériel végétal ou les extraits sont pris par voie interne ou qu'il y a contact externe.

Les symptômes de toxicité systémique résultant de l'ingestion de matériel végétal sont relativement constants chez les *Thymelaeaceae* et ont été bien documentés dans la littérature. Von Oettingen (1958) a décrit les symptômes observés chez l'humain après ingestion d'écorce et de baies de *Daphne mezereum* : inflammation des lèvres, de la langue et du pharynx, sécheresse buccale suivie de salivation, déglutition difficile, soif, rhinite, œdème des paupières, maux de tête, douleurs abdominales, vomissements, diarrhées à selles sanglantes et aqueuses, albuminurie, hématurie, respiration lente, pouls rapide, peau pâle, froide et moite, palpitations musculaires, delirium et somnolence qui peuvent durer plusieurs jours. Ces symptômes sont suivis de convulsions et le pronostic est fatal dans 20-25 % des cas. Le traitement implique généralement la suppression de l'agent causal du tractus gastro-intestinal et des mesures palliatives (Von Oettingen, 1958). Il a également été prétendu qu'une toxicité systémique pouvait résulter d'une simple proximité avec *Daphne cannabina* Wall. (Mitchell et Rook, 1979).

La toxicité pour les animaux domestiques constitue un sérieux problème dans l'industrie du bétail, particulièrement dans le sud de l'Afrique et en Australie. Watt et Breyer-Brandwijk (1933) ont rapporté les résultats d'expériences d'affouragement du bétail impliquant *Lasiosiphon anthylloides* Meissn., une plante des prairies commune dans le sud de l'Afrique. Lorsqu'elle se trouve au stade de la floraison, l'ingestion d'env. 120 g pour un mouton et env. 360 g pour un bovin ou un cheval « entraîne la mort si rapidement, qu'aucun symptôme, hormis des douleurs abdominales aiguës, n'est observé ». L'ingestion de quantités inférieures provoque une gastro-entérite hémorragique, une pyrexie, des inflammations intestinales, puis la mort. Les mêmes auteurs ont également décrit un travail dans lequel des bovins ont été nourris quotidiennement avec env. ½ kg de feuilles de *Gnidia ovalifolia* Meissn. Ces

animaux ont développé des symptômes similaires à ceux décrits auparavant, aggravés d'anorexie, de faiblesse progressive, de desquamation des muqueuses et de congestion rénale. La mort survient dans ce cas en une quinzaine de jours.

Des symptômes du même type se présentent lors de l'intoxication de moutons et de bovins en Australie par des espèces de *Pimelea*, connue sous le nom de « maladie de St-George » (*St. George Disease*) et décrite par Hurst (1942). Les symptômes les plus caractéristiques et gênants pour l'animal sont l'apparition d'une congestion et d'un œdème pulmonaires. Ce problème est pris très au sérieux par le Department of Primary Industries du gouvernement du Queensland australien, qui le décrit sur son site internet (www.dpi.qld.gov.au/). L'empoisonnement survient lorsque les animaux, surtout des bœufs, paissent dans des zones riches en certaines espèces de *Pimelea* : *P. simplex* subsp. *continua* (J.M. Black) S. Threlfall, *P. trichostachya* Lindl. et *P. elongata* S. Threlfall. En cas d'affection aiguë, la mort peut survenir dans les 2 à 3 semaines et décimer ainsi des troupeaux entiers. Comme il n'existe pas de traitement, la seule solution est de retirer les animaux du pâturage contaminé.

Le contact externe avec du matériel végétal provenant de certaines Thymelaeaceae provoque des dermatites inflammatoires avec des rougeurs, des vésicules guérissant lentement et des pustules qui tendent à s'ulcérer. De plus, ces symptômes sont accompagnés de démangeaisons intenses (Von Oettingen, 1958).

Les quelques dizaines de cas d'intoxication par des Thymelaeaceae qui ont été répertoriés (Borris *et al.*, 1988), ont en principe un pronostic positif à moyen terme, car le pouvoir fortement irritant des diterpènes de type tigliane et daphnane empêche une consommation volontaire excessive de ces plantes ! Le cas des animaux qui paissent dans des zones à végétation partiellement toxique et peu diversifiée, déroge bien sûr à cette règle. Les espèces les plus couramment associées à des intoxications font partie des genres *Daphne*, *Daphnopsis*, *Gnidia*, *Lasiosiphon*, *Pimelea* et *Wikstroemia*. Les organes les plus souvent mis en cause sont les baies, les feuilles et l'écorce.

La toxicité des Thymelaeaceae est d'une importance économique considérable en dehors des dégâts qu'elle peut occasionner à l'industrie du bétail. En effet, de nombreux genres sont utilisés comme poisons de pêche en Europe, en Afrique, en Asie et dans les îles du Pacifique

Sud. Certains genres sont aussi d'efficaces poisons de chasse employés en Afrique et en Asie. Relevons également que des cas d'empoisonnements humains criminels ont été rapportés, particulièrement en Afrique (Borris *et al.*, 1988).

2.2.6 Utilisations traditionnelles des *Thymelaeaceae*

2.2.6.1 Utilisations non-médicinales

Le chapitre sur la toxicité des *Thymelaeaceae* nous a déjà permis d'évoquer l'utilisation d'espèces riches en diterpènes comme poisons (chasse, pêche, usage criminel). Le bois de certains genres de la famille est, quant à lui, utilisé pour la production de matériaux de construction et d'objets ornementaux. De plus, de nombreuses espèces possèdent une écorce fibreuse qui sert à la fabrication de papier et de corde. En Inde, en Chine et en Indonésie, le bois de certaines espèces d'*Aquilaria* infecté par un champignon est vendu comme bois odorant et on en tire également de l'encens. Le Tableau 2.1 met en évidence les principaux emplois non-médicinaux des *Thymelaeaceae* à travers le monde.

Tableau 2.1 – Quelques utilisations non-médicinales répertoriées des *Thymelaeaceae*
(Borris *et al.*, 1988 ; Gelfand *et al.*, 1985).

Plante	Partie	Utilisation	Région
<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb.	bois	encens, bois odorant (« bois d'aigle », « bois d'aloès »), sculptures ornementales	Inde, Chine
	écorce	fabrication de papier	Inde, Chine
	H.E.	parfumerie	Inde, Chine
<i>A. malaccensis</i> Lamk.	écorce	fabrication de corde	Inde
	bois	encens, fumigations	Inde, Indonésie

Plante	Partie	Utilisation	Région
<i>Dais glaucescens</i> Decne.	écorce	fabrication de ficelle	Afrique, Madagascar
<i>Daphne</i> spp.	écorce	poisons de pêche, fabrication de papier et de corde	Afrique, Chine, Inde, pourtour méditerranéen
<i>D. mezereum</i> L.	fruit	substitut au poivre rouge	Europe
<i>Daphnopsis brasiliensis</i> Mart. et Zucc.	écorce	fabrication de papier	Brésil
<i>Dicranolepis persei</i> Cummins.	fruit	comestible	Ghana
<i>Dirca pallustris</i> L.	écorce	utilisée par les Indiens pour la fabrication de sandales, de cordes à arc et de paniers	Etats-Unis d'Amérique
<i>Edgeworthia</i> spp.	écorce	fabrication de papier	Japon, Népal, Rép. Tchèque
<i>E. gardneri</i> Meissn.	écorce	molluscicide	Inde
<i>Gnidia</i> spp.	*	fabrication d'habits	Afrique
	écorce	fabrication de papier et de corde	Madagascar, Ethiopie
<i>G. kraussiana</i> Meissn.	racine, tige, feuilles	molluscicide	Soudan
	extrait	poisons de flèche, de pêche et à usage criminel	Afrique
<i>Gonystylus</i> spp.	bois	fabrication de planches	Japon, Malaisie, îles du Pacifique

Plante	Partie	Utilisation	Région
<i>G. macrophyllus</i> (Miq.) Airy Shaw	bois	bois odorant	Indonésie
<i>Lagetta linearia</i> Lam.	écorce	décoration	Antilles
<i>Lasiosiphon</i> spp.	feuilles ou racines	extraits comme poisons de flèche, de pêche et à usage criminel	Afrique, Inde,
<i>Passerina</i> spp.	*	fabrication d'une teinture jaune	Afrique
	écorce	fabrication de papier	Afrique
<i>Peddiea africana</i> Harv.	plante ent.	poison à usage criminel	Zimbabwe
<i>P. fischeri</i> Engl., <i>P. longiflora</i> Engl. et Gilg	fruit	comestible	Guinée
<i>Synaptolepis alternifolia</i> Oliv.	racine	poison de pêche	Zimbabwe
<i>Thymelaea</i> spp.	écorce	fabrication de fibre, de papier et de teinture jaune	Afrique, Egypte, Israël
<i>Wikstroemia</i> spp.	*	poison de pêche	Guam, Hawaii, Malaisie
	écorce	fabrication de fibre et de papier	Japon
<i>W. tenuiramis</i> Miq.	bois	bois odorant	Indonésie
<i>W. viridiflora</i> Meissn.	écorce	fabrication de filets de pêche	Polynésie

* non précisé

2.2.6.2 Utilisations médicinales

Les médecines traditionnelles d'un grand nombre de cultures utilisent des Thymelaeaceae pour la préparation de traitements d'une gamme très étendue de troubles. Les emplois comme émétique, purgatif, vésicant et pour le traitement de maladies de la peau, sont des exemples de l'utilisation des effets toxiques de ces remèdes traditionnels. Dans ces applications, les doses sont cependant faibles, afin de favoriser l'effet bénéfique par rapport aux effets secondaires. Les bases de l'utilisation de ces plantes dans le traitement d'autres maux, tels que morsures de serpents, piquûres de scorpions, malaria et affections ophtalmiques, ne sont pas claires (Borris *et al.*, 1988).

Les médecines européennes et américaines ont également utilisé des préparations similaires jusqu'au début du 20^{ème} siècle. Ainsi, des préparations à base d'écorce de certaines *Daphne* ont été employées dans une variété d'indications en Europe et aux Etats-Unis. Quelques unes de ces préparations se trouvaient dans l'USP (United States Pharmacopoea) jusqu'en 1926. En Suisse, il est à relever que l'écorce de bois gentil (« Cortex Mezerei ») figurait dans la 5^{ème} édition de la Pharmacopée Helvétique jusqu'à ce que celle-ci soit remplacée par la 6^{ème} édition en 1971 ! L'usage officinal interne de la drogue, sous forme de décoction, comme remède purgatif, anti-rhumatismal ou anti-syphilitique, était heureusement abandonné depuis longtemps. Seules subsistaient des indications externes sous forme d'emplâtres ou de pommades rubéifiantes ou vésicantes, à présent caduques.

L'intérêt dans l'utilisation médicinale des Thymelaeaceae ne s'est cependant pas éteint en Europe avec l'abandon des préparations officinales. En France, des extraits de *Lasiosiphon kraussianus* Hutch. et Dalz. (syn. *Gnidia kraussiana* Meissn.) ont été brevetés pour le traitement de la lèpre (Tubery, 1968 et 1969). En Chine, une préparation de *Daphne giraldii* Nitsche est l'un des constituants d'une préparation à effet analgésique longue durée pour le traitement des hémorroïdes (Ren, 1978). Des études cliniques ont été conduites en Chine sur des préparations d'espèces de *Daphne* (Kupchan et Baxter, 1975), *Gnidia* (Kupchan *et al.*, 1975a, 1976a et 1976b), *Wikstroemia* (Tandon et Rastogi, 1976 ; Torrance *et al.*, 1979) et *Pimelea* (Cashmore *et al.*, 1976 ; Howard et Howden, 1975), mettant en évidence leurs propriétés anticancéreuses. Les propriétés abortives et anticancéreuses de ces produits ont été attribuées principalement à la présence d'esters de daphnane, parmi lesquels certaines

molécules possèdent une activité pro-tumorale documentée. Les esters de daphnane peuvent donc être considérés comme des facteurs de risque de cancer iatrogène et leur emploi thérapeutique est donc délicat (Hecker, 1981). Des plantes de la famille des Thymelaeaceae ont été incluses dans de nombreux criblages à large échelle, à la recherche d'activités biologiques des plus diverses (Bhakuni *et al.*, 1969 et 1976 ; Dhar *et al.*, 1968 et 1973 ; Kapoor *et al.*, 1975 ; Matsui *et al.*, 1967). Les utilisations médicinales des Thymelaeaceae sont nombreuses, et comme les plantes étudiées dans le présent travail sont toutes d'origine africaine, le Tableau 2.2 résume surtout les emplois traditionnels répertoriés dans ce continent. Sont absentes de cette liste toutes les indications traditionnelles faisant intervenir des causes surnaturelles, car elles nécessiteraient à elles seules un chapitre d'introduction aux médecines traditionnelles africaines.

Tableau 2.2 – Quelques utilisations médicinales répertoriées des Thymelaeaceae
(Borris *et al.*, 1988 ; Gelfand *et al.*, 1985 ; Iwu, 1993 ; Kokwaro, 1993).

Plante	Partie	Utilisation	Région
<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb.	bois	aphrodisiaque, stimulant, etc.	Inde, Chine
<i>Arthrosolen chrysanthus</i> Solms-Laub.	racine	décoctions contre la malaria et les rhumatismes	Tanzanie
	feuille	bain contre la malaria	Tanzanie
<i>A. gymnostachys</i> C.A. Mey.	feuille	fumée contre les maux de tête	Afrique
<i>A. polycephalus</i> C.A. Mey.	racine	asthme	Afrique
		décoction contre le « lamsiekte » (botulisme du bétail)	Afrique australe
<i>Craterosiphon scandens</i> Enlg.	racine	abortif	Nigéria
<i>C. quarrei</i> Staner	feuilles, tige	lumbago, entorses, tonique	Afrique
<i>Daphne gnidium</i> L.	écorce	hépatite	Tunisie
<i>Dicranolepis lacinata</i> Gilg.	*	aphrodisiaque	Afrique

Plante	Partie	Utilisation	Région
<i>D. persei</i> Cummins.	*	troubles hépatiques	Afrique
	fleur	extrait laxatif	Ghana
	fruit	purgatif	Ghana
	racine	décoction purgative	Côte d'Ivoire
	graine	extrait purgatif et stimulant le travail de l'accouchement	Ghana
<i>Gnidia buchananii</i> Gilg	racine	décoction contre la bronchite et les douleurs abdominales	Afrique
<i>G. capitata</i> Linn. f.	racine	fumée antiasthmatique, infusion contre les maladies vénériennes, décoction contre l'amygdalite	Zimbabwe
<i>G. chrysantha</i> Gilg	racine	réduction de l'orifice vaginal	Zimbabwe
	racine, fleur	abortif et purgatif	Afrique
<i>G. glabra</i> H.H.W. Pearson	racine	poudre mél. à du lait de chameau comme laxatif, ou à un bouillon de viande comme émétique	Somalie
<i>G. glauca</i> Steud.	racine	décoction contre l'indigestion	Afrique
<i>G. goetzeana</i> Gilg	racine	mâchée contre la toux	Afrique
<i>G. involucrata</i> Steud. ex A. Rich.	racine	laxative et vermifuge	Ethiopie
		réduction de l'orifice vaginal	Zimbabwe
<i>G. kraussiana</i> Meissn.	racine	décoction contre les douleurs abdominales et autre indications	Afrique
<i>G. latifolia</i> Gilg	écorce de racine	décoction purgative	Afrique

Plante	Partie	Utilisation	Région
<i>G. microcephala</i> Meissn.	racine	mâchée comme aphrodisiaque réduction de l'orifice vaginal	Afrique Zimbabwe
<i>G. somalensis</i> Gilg	racine	mâchée contre la tuberculose	Somalie
<i>G. stenophylloides</i> Gilg	racine	décoction antiblénorrhagique	Somalie
<i>Lasiosiphon</i> spp.	racine	« panacée »	Afrique
<i>Passerina ericoides</i> L.	*	« panacée »	Afrique
<i>P. filiformis</i> L.	*	décoction analgésique	Afrique
<i>P. hirsuta</i> L.	feuille	laxatif et emplâtre contre les abcès	Afrique
<i>Peddiea fischeri</i> Engl.	*	« panacée »	Afrique
<i>Struthiola thomsoni</i> Oliv.	écorce	mâchée contre la toux	Afrique
<i>Synaptolepis alternifolia</i> Oliv.	racine	mâchée contre les morsures de serpents, décoction purgative	Afrique
<i>S. kirkii</i> Oliv.	racine	infus. émétique et anti-épileptique	Zimbabwe
<i>S. longiflora</i> Gilg	feuille	extrait antituberculeux	Tanzanie
	racine	poudre ascaricide et purgative	Tanzanie
<i>Thymelaea</i> spp.	*	« panacée »	Afrique
<i>Wikstroemia indica</i> C.A. Mey.	*	abortif, émétique, purgatif, anti- syphilitique	N ^{elle} -Calédonie
<i>W. viridiflora</i> Meissn.	écorce	purgatif et vésicant	Madagascar

* non précisé

2.3 Présentation de *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich.

2.3.1 Introduction

Parmi les différentes Thymelaeaceae étudiées dans ce travail (cf. 5.1), une espèce a été choisie pour une investigation plus poussée. Il s'agit de *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich., un sous-arbrisseau utilisé en médecine traditionnelle africaine pour des applications variables (cf. Tableau 2.2). Au Zimbabwe, où son emploi est fréquent, les *n'anga* (tradipraticiens) l'appellent « *muwito* » ou « *katonje* » en dialecte shona. Ces dénominations vernaculaires ont cependant le grand désavantage de désigner également d'autres espèces de *Gnidia* : *G. capitata*, *G. chrysantha* et *G. microcephala* !

Outre son intérêt en médecine traditionnelle, *G. involucrata* possède le grand avantage de n'avoir jamais été investiguée avant nos travaux et les criblages chimique et biologique se sont avérés prometteurs (cf. 3.2 et 3.3).

2.3.2 Caractères morphologiques et répartition géographique

G. involucrata (Figure 2.5) est une herbe ou un sous-arbrisseau pérenne, peu à très ramifié, possédant un rhizome ligneux et pouvant atteindre la taille de 1 m ou plus. Ses tiges et ses branches sont glabres, de couleur verte à rougeâtre, parfois brunâtre. Les feuilles sont sessiles ou faiblement pétiolées, linéaires à elliptiques, obtuses à aiguës, glauques (recouvertes d'un fin duvet bleu-gris, bleu-vert ou blanc) ou parfois glabres. Les fleurs, regroupées en capitules terminaux ou axillaires, sont orange-rouge ou rosâtre à rouge, tétramères (rarement pentamères). Leur pédicelle est recouvert de poils soyeux ; le tube du calice est fortement pubescent au-dessus de l'articulation. Les pétales sont obovales à spatulés et charnus, longs de 1-1,5 mm, larges de 0,3-1,2 mm ; le tube du calice est long de 8-12 mm, avec des lobes de 2-3 mm de long et 0,5-2 mm de large.

Comme on peut le remarquer, *G. involucrata* est une espèce très variable, particulièrement dans son degré de ramification, qui semble être lié aux variations saisonnières et à la fréquence des incendies endurés.



**Figure 2.5 – Photographie de l’extrémité d’un rameau fleuri
de *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. (Blundell, 1987).**

G. involucrata se rencontre dans des prairies ouvertes et boisées, souvent dans des zones à incendies, mais aussi dans la brousse et les forêts caduques, à des altitudes de 1000-2700 m. Sa répartition géographique est la suivante : nord du Kenya, Tanzanie, nord de l’Ouganda, Ethiopie, Soudan, de la R. D. du Congo vers le sud jusqu’au Zimbabwe et Mozambique (Blundell, 1987). Le matériel végétal étudié dans ce travail (parties aériennes et racine de *G. involucrata*) a été récolté près de Rukuru Bridge (Nyika Plateau) au Malawi par M. le D^r J.D. Msonthi, (Department of Chemistry, University of Swaziland, Kwaluseni, Swaziland). Son identification a été menée par M. H. Patel du National Herbarium of Malawi (Zomba, Malawi).

3 Résultats

3.1 Préparation des extraits bruts

Dans le présent travail, 30 extraits bruts ont été préparés à partir des 8 Thymelaeaceae africaines récoltées lors de différentes missions scientifiques de l'Institut de Pharmacognosie et de Phytochimie (IPP). Le matériel végétal et le protocole d'extraction standard sont décrits au chapitre 5.1. L'épuisement successif des drogues séchées par du dichlorométhane et du méthanol permet l'extraction d'une grande partie de leurs constituants. Des extraits éthanoliques et aqueux ont été préparés lorsque la quantité de matériel à disposition le permettait. Le résultat de ces extractions est présenté dans le Tableau 3.1.

Tableau 3.1 – Extraits préparés à partir de Thymelaeaceae africaines.

Nom botanique (origine)	Organe (poids sec initial)	Extrait	Poids	Rendement
<i>Dais cotonifolia</i> L. (Zimbabwe)	feuilles (140 g)	DCM	7,1 g	5,1 %
		MeOH	11,0 g	7,9 %
	écorce de tige (50 g)	DCM	0,8 g	1,6 %
		MeOH	3,2 g	6,4 %
<i>Gnidia capitata</i> L.f. (Zimbabwe)	parties aériennes (330 g)	DCM	4,9 g	1,5 %
		MeOH	34,7 g	10,5 %
	racines (250 g)	DCM	2,9 g	1,2 %
		MeOH	36,2 g	14,5 %
<i>G. involucrata</i> Steud. ex A. Rich. (Malawi)	parties aériennes (250 g)	DCM	3,6 g	1,4 %
		MeOH	31,1 g	12,4 %
	parties aériennes (50 g)	H ₂ O	6,7 g	13,4 %

Nom botanique (origine)	Organe (poids sec initial)	Extrait	Poids	Rendement
<i>G. involucrate</i> (suite)	racines (250 g)	DCM	2,0 g	0,8 %
		MeOH	38,5 g	15,4 %
<i>G. kraussiana</i> Meissn. (Zimbabwe)	racines (250 g)	DCM	4,2 g	1,7 %
		MeOH	35,6 g	14,2 %
	racines (50 g)	EtOH 25 %	3,8 g	7,6 %
<i>G. microcephala</i> Meissn. (Zimbabwe)	feuilles (120 g)	DCM	1,8 g	1,5 %
		MeOH	15,2 g	12,7 %
	racines (260 g)	DCM	2,2 g	0,8 %
		MeOH	38,6 g	14,8 %
<i>Passerina montana</i> Thoday. (Zimbabwe)	parties aériennes (250 g)	DCM	8,0 g	3,2 %
		MeOH	18,2 g	7,3 %
	parties aériennes (50 g)	EtOH 25 %	4,7 g	9,4 %
		H ₂ O	5,5 g	11,0 %
<i>Synaptolepis kirkii</i> Gilg (Zimbabwe)	écorce de racine (180 g)	DCM	3,9 g	2,2 %
		MeOH	15,1 g	8,4 %
<i>Wikstroemia indica</i> C.A. Mey. (Île Maurice)	feuilles (280 g)	DCM	6,9 g	2,5 %
		MeOH	24,4 g	8,7 %
	brindilles et écorce de tige (250 g)	DCM	3,7 g	1,5 %
		MeOH	34,7 g	13,9 %

3.2 Criblage chimique général et analyses LC/DAD-UV préliminaires

3.2.1 Introduction

Les extraits bruts ont été solubilisés à raison de 10 mg/ml dans un solvant adéquat : le dichlorométhane pour les extraits apolaires et le méthanol pour les extraits polaires. Ils ont ensuite été séparés sur TLC dans les conditions générales décrites sous 5.2.1. Outre l'observation sous rayonnement UV à 254 nm et 366 nm, les plaques ont été révélées à l'aide des réactifs chimiques présentés au point 5.5.1, afin de donner un premier aperçu de la composition des échantillons analysés.

Pour les analyses LC/DAD-UV, les extraits bruts ont été préalablement solubilisés à raison de 10 mg/ml dans un solvant adéquat : le tétrahydrofurane (THF) pour les extraits apolaires et le méthanol pour les extraits polaires. Après centrifugation et décantation, pour ôter les particules en suspension, les solutions d'échantillon ont été injectées dans un système HPLC (*cf.* 5.2.2), dont les paramètres expérimentaux étaient les suivants :

- échantillon : 10 µl de solution à 10 mg/ml d'extrait ;
- colonne : Nova-Pak C₁₈ (4 µm, 150 x 3,9 mm d.i. ; Waters) ;
- phase mobile : débit 1 ml/min avec les gradients linéaires suivants :
 - a) MeCN-H₂O (+ 0,05 % TFA) 5:95 → 80:20 en 50 min
(extraits apolaires) ou
 - b) MeOH-H₂O (+ 0,05 % TFA) 10:90 → 100:0 en 50 min
(extraits polaires) ;
- détection : traces LC/UV à 210 nm, 254 nm, 280 nm et 366 nm relevées avec un détecteur à barrettes de diodes (190-500 nm).

3.2.2 Résultats et discussions

Le criblage chimique sur plaque TLC a permis de mettre en évidence la présence de coumarines (acétate de plomb, fluor. vertes à 366 nm) et de flavonoïdes (NST/PEG, fluor. colorées à 366 nm) dans tous les extraits bruts apolaires étudiés. Dans les extraits bruts polaires, de nombreux glycosides de flavonoïdes ont été détectés (Wagner et Bladt, 1996).

La révélation des plaques TLC au réactif de Godin (1954) a montré la présence systématique, dans les extraits bruts polaires, de tanins sur la ligne de dépôt (coloration rouge ; Wagner et Bladt, 1996). Bien que les tanins ne soient pas fréquents chez les Thymelaeaceae, leur présence peut être soupçonnée par ce biais ! L'observation des plaques TLC après vaporisation du réactif de Dragendorff n'a pas permis de mettre en évidence des quantités détectables d'alcaloïdes dans les extraits étudiés.

Les analyses LC/DAD-UV ont clairement montré la richesse en composés phénoliques des extraits méthanoliques des Thymelaeaceae étudiées. Pour illustrer cette observation, les exemples des extraits méthanoliques des parties aériennes et des racines de *Gnidia involucrata* (Figure 3.1) ainsi que des feuilles et de l'écorce de tige de *Wikstroemia indica* (Figure 3.2) sont présentés.

Comme on peut le voir sur ces figures, de nombreux composés présentent des spectres caractéristiques de flavanones, de dihydroflavonols, de flavones et de flavonols. Si ce résultat était prévisible au vu des études antérieures sur les constituants des Thymelaeaceae, il en est tout autrement de la présence de spectres caractéristiques de xanthones ! Cette observation nous a incités à concentrer notre travail sur les extraits polaires des Thymelaeaceae. Dans ces extraits, on remarque également une déformation de la ligne de base, suggérant encore une fois la présence de tanins.

Le choix de l'échantillon à étudier en particulier a ensuite été guidé par l'apparence du tracé LC/DAD-UV et la quantité de travaux phytochimiques antérieurs. Tous ces critères réunis nous ont amenés à choisir les extraits méthanoliques de *Gnidia involucrata*, jamais étudiés jusqu'ici et présentant un chromatogramme LC/UV de très bonne résolution.

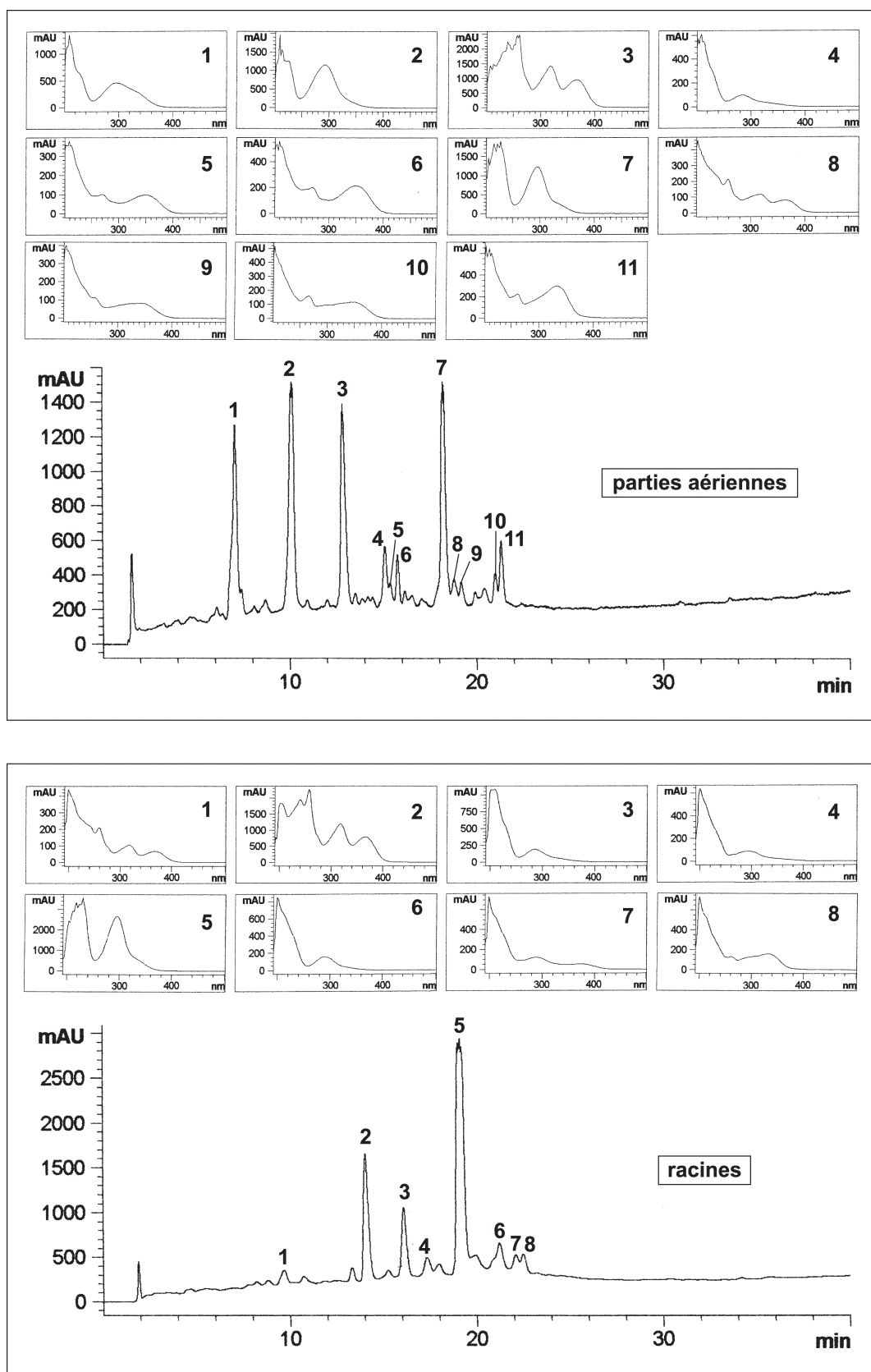


Figure 3.1 – Chromatogrammes LC/DAD-UV à 210 nm et spectres enregistrés *on-line* d'extraits méthanoliques de *Gnidia involucrata*. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.1.

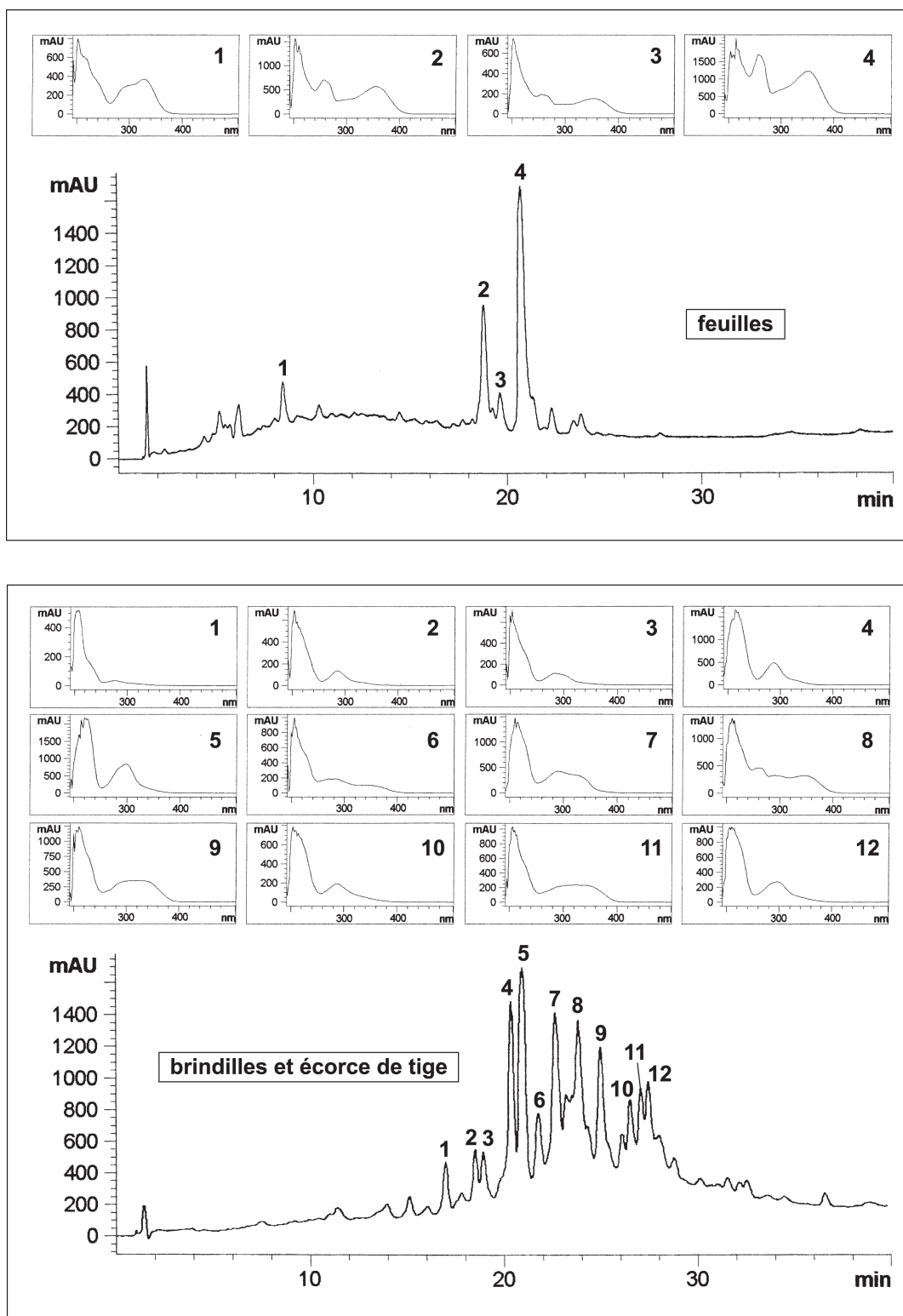


Figure 3.2 – Chromatogrammes LC/DAD-UV à 210 nm et spectres enregistrés *on-line* d'extraits méthanoliques de *Wikstroemia indica*. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.1.

3.3 Criblage biologique et biochimique général

3.3.1 Introduction

Les 30 extraits bruts dont il était question précédemment ont également été soumis aux tests biologiques et biochimiques menés en routine dans notre laboratoire, afin de déterminer leur potentiel bioactif. Ces tests sont décrits en détail aux chapitres 5.5 et 5.6 et permettent d'évaluer les activités suivantes :

- antifongique sur *Cladosporium cucumerinum* (C.c.) ;
- antifongique sur *Candida albicans* (C.a.) ;
- antibactérien sur *Bacillus subtilis* (B.s.) ;
- larvicide sur *Aedes aegypti* (A.e.) ;
- molluscicide sur *Biomphalaria glabrata* (B.g.) ;
- antiradicalaire avec l'emploi d'un réactif au DPPH ;
- inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE).

3.3.2 Résultats et discussions

Le Tableau 3.2 présente les résultats du criblage biologique et biochimique opéré sur les extraits bruts préparés. L'appréciation des activités a été faite sur la base de l'échelle relative qui a cours dans notre laboratoire. Elle a donc une valeur plus comparative qu'absolue ! Précisons que le test sur l'activité inhibitrice de l'AChE n'a été introduit en routine que dans le dernier trimestre 2001. Il n'a donc en aucune façon été déterminant pour le choix du matériel à étudier plus avant.

Tableau 3.2 – Criblage biologique et biochimique des extraits bruts.

Nom botanique	Organe	Extrait	C.c.	C.a.	B.s.	A.e.	B.g.	DPPH	AChE
Dais cotonifolia	feuilles	DCM	+	-	+	-	n.d.	+	+
		MeOH	-	-	-	-	n.d.	+	-
	écorce de tige	DCM	(+)	(+)	+	-	n.d.	+	+
		MeOH	-	-	(+)	-	n.d.	++	-
Gnidia capitata	parties aériennes	DCM	-	-	-	-	+	(+)	+
		MeOH	-	-	+	-	+	++	-
	racines	DCM	(+)	-	+	+	+	(+)	+
		MeOH	-	-	++	+	+	++	-
G. involucrata	parties aériennes	DCM	(+)	-	+	-	+	-	+
		MeOH	-	-	+	-	+	+	-
		H2O	-	-	(+)	-	+	+	-
	racines	DCM	-	-	-	-	-	+	+
		MeOH	-	-	+	-	+	+	-
G. kraussiana	racines	DCM	(+)	(+)	++	-	+	(+)	+
		MeOH	-	-	-	-	+	(+)	-
		EtOH	-	-	-	-	-	-	-
G. microcephala	feuilles	DCM	-	-	-	-	-	-	+
		MeOH	-	-	-	-	+	+	-

Nom botanique	Organe	Extrait	C.c.	C.a.	B.s.	A.e.	B.g.	DPPH	AChE
<i>G. microcephala</i>	racines	DCM	(+)	-	-	-	-	+	+
		MeOH	-	-	-	-	++	+	-
<i>Passerina montana</i>	parties aériennes	DCM	(+)	-	++	-	n.d.	(+)	+
		MeOH	-	-	+	-	n.d.	+	+
		EtOH	+	-	+	-	n.d.	+	-
		H ₂ O	-	-	+	-	n.d.	+	-
<i>Synaptolepis kirkii</i>	racines	DCM	(+)	-	+	+	+	(+)	+
		MeOH	-	-	++	+	-	+	-
<i>Wikstroemia indica</i>	feuilles	DCM	+	-	-	-	-	-	+
		MeOH	(+)	-	+	-	-	++	-
	brindilles et écorce de tige	DCM	-	-	-	-	+	+	+
		MeOH	-	-	++	-	-	+	-
Résultats positifs :			11/30	2/30	19/30	4/30	14/22	26/30	14/30

- : aucune activité (+) : activité faible + : activité moyenne ++ : activité forte
n.d. : activité non déterminée

Pour commencer, il est important de préciser qu'un résultat observé lors de l'évaluation d'un extrait brut ou d'une fraction enrichie est la composante de deux paramètres : l'activité intrinsèque des produits actifs et leur quantité relative dans l'extrait. Par exemple, une activité avérée d'un extrait peut aussi bien être le reflet d'une faible quantité de constituants très actifs que d'une grande quantité de constituants peu actifs ! En résumé, les résultats de telles investigations doivent toujours être analysés avec un esprit critique.

Seuls deux extraits (6,7 %) ont montré une faible activité contre la levure *Candida albicans* : les extraits dichlorométhaniques de l'écorce de tige de *Dais cotonifolia* et des racines de *Gnidia kraussiana*. Un peu plus du tiers des extraits étudiés (36,7 %), en majorité apolaires (9/11), se sont révélés faiblement actifs sur la moisissure phytopathogène *Cladosporium cucumerinum*. Aucune conclusion ne peut être raisonnablement être tirée sur la base d'un si faible nombre d'activités et ces résultats n'ont donc pas été déterminants pour la suite du présent travail.

Le test sur *Bacillus subtilis* a permis de détecter un grand nombre de zones d'inhibition (63,3 %), mais cette cible est réputée très sensible et de nombreux résultats « faux-positifs » sont possibles. Pour preuve, on relèvera la variabilité dans les extraits concernés (polarités et organes différents).

Il est intéressant de remarquer l'absence apparente de corrélation entre les résultats des trois différents tests antimicrobiens. Comme le relevait Rahalison (1994) dans son travail de thèse, il n'y a qu'une faible corrélation entre les résultats obtenus à l'aide de la bioautographie « agar overlay » avec *C. albicans* et la bioautographie directe avec *C. cucumerinum* sur les extraits bruts. Pour l'évaluation du potentiel antibiotique d'un extrait, il est donc préférable de le tester à l'égard de plusieurs cibles, car chacune d'elles possède des structures cellulaires et un métabolisme particuliers. Ainsi, on peut d'emblée se méfier des extraits actifs sur les trois cibles unicellulaires, car alors une cytotoxicité non spécifique est à soupçonner.

Seuls quatre extraits (13,3 %) ont montré une toxicité de 100 % envers les larves du moustique *Aedes aegypti*. Il s'agit des extraits dichlorométhaniques et méthanoliques des racines de *Gnidia capitata* et de *Synaptolepis kirkii*.

Le test molluscicide sur *Biomphalaria glabrata* a donné 14 résultats positifs sur les 22 extraits évalués (63,6 %). Le fait que la plupart des extraits polaires soient actifs peut s'expliquer par leur teneur en tanins, comme l'ont montré Schaufelberger et Hostettmann (1982) avec la disparition de l'effet après que les extraits actifs ont été débarrassés de ces dérivés polyphénoliques. Par contre, la contribution de saponines à l'effet molluscicide (Marston *et al.*, 1993) est à exclure, car les Thymelaeaceae semblent en être dépourvues (*cf.* 2.2.3).

Presque tous les extraits étudiés (86,7 %) et tous les extraits méthanoliques ont réagi positivement au test antiradicalaire avec le DPPH. Ce chiffre s'explique par la présence, dans les extraits polaires et apolaires des Thymelaeaceae, de nombreux composés phénoliques de type flavonoïde, dont l'activité antiradicalaire a été largement documentée (Potterat, 1997).

Le test d'inhibition de l'acétylcholinestérase s'est révélé positif avec les 13 extraits dichlorométhaniques évalués et l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Passerina montana* (46,7 %). Ce résultat est encourageant, car il laisserait penser que certains constituants peu polaires des Thymelaeaceae possèdent une activité bloquant la dégradation de l'AChE, enzyme-clef dans le développement du syndrome d'Alzheimer. Chez les plantes, ce sont généralement des alcaloïdes (physostigmine, galanthamine, alcaloïdes stéroïdiques des Solanaceae, etc.) qui sont responsables de cet effet (Marston *et al.*, 2002), mais les Thymelaeaceae en sont dépourvues (*cf.* 2.2.3). Il faut cependant prendre en compte que certains insecticides synthétiques utilisés pour protéger des cultures en plein air (dérivés organophosphorés, carbamates,...) se sont révélés de puissants inhibiteurs de cholinestérases (Mendoza et Shields, 1973 ; Weins et Jork, 1996) et que certains échantillons végétaux ont pu être contaminés par ce biais. Malheureusement, ce test ayant été introduit vers la fin du présent travail, il n'a pas été possible d'explorer plus loin cette piste. Relevons néanmoins qu'une corrélation entre l'activité molluscicide et anticholinestérasique a été montrée pour le latex d'*Euphorbia royleana* Boiss. (Euphorbiaceae), riche en diterpènes irritants (Singh et Agarwal, 1984). Cette étude pourrait aussi expliquer l'activité molluscicide observée de certains extraits dichlorométhaniques des Thymelaeaceae analysées.

Les tests antifongiques, antibactérien, antiradicalaire et anticholinestérasique ont été réalisés sur TLC. Il s'agit d'un support qui offre l'avantage de pouvoir solubiliser l'extrait à évaluer dans le solvant le plus approprié. De plus, leur facilité d'emploi en fait des outils adaptés au fractionnement guidé par l'activité d'extraits bioactifs. Cependant, aucun de ces tests sur TLC n'a fourni de résultats satisfaisants pour mener à bien ce type d'approche dans le présent travail. Le fractionnement décrit sous 3.4.5 a donc été suivi par les informations LC/DAD-UV, car les composés phénoliques des extraits étudiés possèdent une bonne réponse à ce mode de détection très simple et rapide.

3.4 Investigation phytochimique de *Gnidia involucrata*

3.4.1 Introduction

Comme nous l'avons précédemment évoqué, *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. possède plusieurs caractéristiques qui rendent son étude approfondie intéressante :

- aucun travail phytochimique antérieur n'a été publié sur cette espèce ;
- les analyses LC/DAD-UV des extraits méthanoliques laissent présager la découverte de composés non encore répertoriés dans la famille (p. ex. xanthones) ;
- son usage est répandu en médecine traditionnelle africaine (laxatif, vermifuge, réduction de l'orifice vaginal).

Avant d'entreprendre le fractionnement des extraits méthanoliques de cette plante, il convenait de vérifier d'abord une observation relevée lors des criblages chimique et biologique. En effet, il y ressort que les Thymelaeaceae étudiées dans le cadre de ce travail ont une teneur non négligeable en tanins, contrairement à ce qui est généralement admis pour cette famille (Borris *et al.*, 1988). Nous avons donc entrepris le dosage de cette classe de constituants pour en déterminer l'ordre de grandeur dans les parties aériennes et les racines de *G. involucrata*.

3.4.2 Détermination de la teneur en tanins

Le dosage choisi, décrit dans la Pharmacopée Européenne 3, consiste à mesurer l'absorbance à la longueur d'onde du maximum de l'acide phosphomolybdotungstique, après réduction par les polyphénols. La méthode employée tire profit de la propriété qu'ont les tanins, et eux seuls, d'établir des liaisons entre des macromolécules, comme par exemple les fibres de collagène de la peau. En traitant l'échantillon à analyser avec de la « poudre de peau », seuls

les polyphénols non tanniques seront dosés. La teneur en tanins peut donc être déterminée par différence avec le résultat obtenu sur une prise d'échantillon non traité. Par convention, le résultat est exprimé en pyrogallol. Les résultats obtenus pour les parties aériennes et les racines de *Gnidia involucrata* sont donnés dans le Tableau 3.3. Le principe et le mode opératoire détaillés du dosage sont développés au chapitre 5.8.

Tableau 3.3 – Résultats de la détermination des tanins dans *Gnidia involucrata*

Echantillon (prise d'essai m_1 [g])		Absorbance mesurée à 760 nm		Teneur en tanins [%]*	
		A_1	A_2	x_i	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ **
parties aériennes	PA 1 (0,752)	0,220	0,050	4,56	4,7 ± 0,17
	PA 2 (0,751)	0,231	0,049	4,86	
	PA 3 (0,752)	0,225	0,049	4,72	
racines	R 1 (0,754)	0,249	0,030	5,86	5,81 ± 0,047
	R 2 (0,751)	0,244	0,028	5,80	
	R 3 (0,750)	0,242	0,027	5,78	
Témoin (masse m_2 [g])		A_3	\bar{A}_3	* exprimée en pyrogallol d'après la formule :	
pyrogallol	T 1 (0,051)	0,155	0,155 ($\bar{m}_2 = 0,050$ g)	$\frac{62,5 (A_1 - A_2) m_2}{A_3 \cdot m_1}$	
	T 2 (0,050)	0,150		** écart-type de la moyenne de 3 mesures calculé d'après la formule :	
	T 3 (0,050)	0,159		$s_{\bar{x}} = \frac{1}{0,724} \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{3}}$	

Les teneurs respectives en tanins de 4,7 % et 5,8 % pour les parties aériennes et les racines de *G. involucrata* sont à comparer aux teneurs de quelques drogues à tanins connues (Stahl et Shild, 1981) :

- feuille de châtaigner (*Castanea sativa* Miller, Fagaceae) : 9 % ;
- galle de chêne (*Quercus infectoria* Olivier, Fagaceae) : 25-40 % ;
- écorce de chêne (*Quercus robur* L., Fagaceae) : 10-20 %

- feuille d'hamamélis (*Hamamelis virginiana* L., Hamamelidaceae) : env. 3 % ;
- feuille de noyer (*Juglans regia* L., Juglandaceae) : env. 5 % ;
- fruit de myrtille (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) : 5-10 % ;
- racine de ratanhia (*Krameria triandra* Ruiz et Pavon, Krameriaceae): 8-10 % ;
- feuille de thé noir (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze., Theaceae) : 10-25 % ;

G. involucrata peut donc être considérée comme une plante à tanins. Ces derniers sont certainement des dérivés du leucocyanidol, comme il en a déjà été découvert dans certaines Thymelaeaceae (Hegnauer, 1973).

3.4.3 Des tanins et de l'usage traditionnel de la plante

La découverte de quantités non négligeables de tanins dans *G. involucrata* est l'occasion de développer une réflexion rationnelle sur l'utilisation de cette plante en application externe pour resserrer le vagin détendu des femmes dans la période qui suit l'accouchement. Rappelons au passage que deux autres espèces de *Gnidia* possèdent la même indication traditionnelle au Zimbabwe et au Malawi : *G. chrysantha* et *G. microcephala* (Gelfand *et al.*, 1985).

En effet, ces polyphénols sont réputés pour leur astringence, découlant de leur affinité pour les protéines. En application externe, on observe ainsi un effet imperméabilisant des couches les moins profondes de la peau et des muqueuses, et la constriction des petits vaisseaux superficiels. Ce resserrement tissulaire entraîne une protection accrue des tissus muco-cutanés et favorise leur régénération (Bruneton, 1999). On imagine donc aisément que les tanins de *G. involucrata* puissent contribuer au rétrécissement vaginal après application locale de la drogue pulvérisée. De nombreux écrits anciens de cultures les plus diverses, dont le plus célèbre est le Kâma-Sûtra, mentionnent d'ailleurs l'utilisation de drogues à tanins sous forme de douches locales pour rétrécir le vagin. Il est intéressant de relever que d'anciens

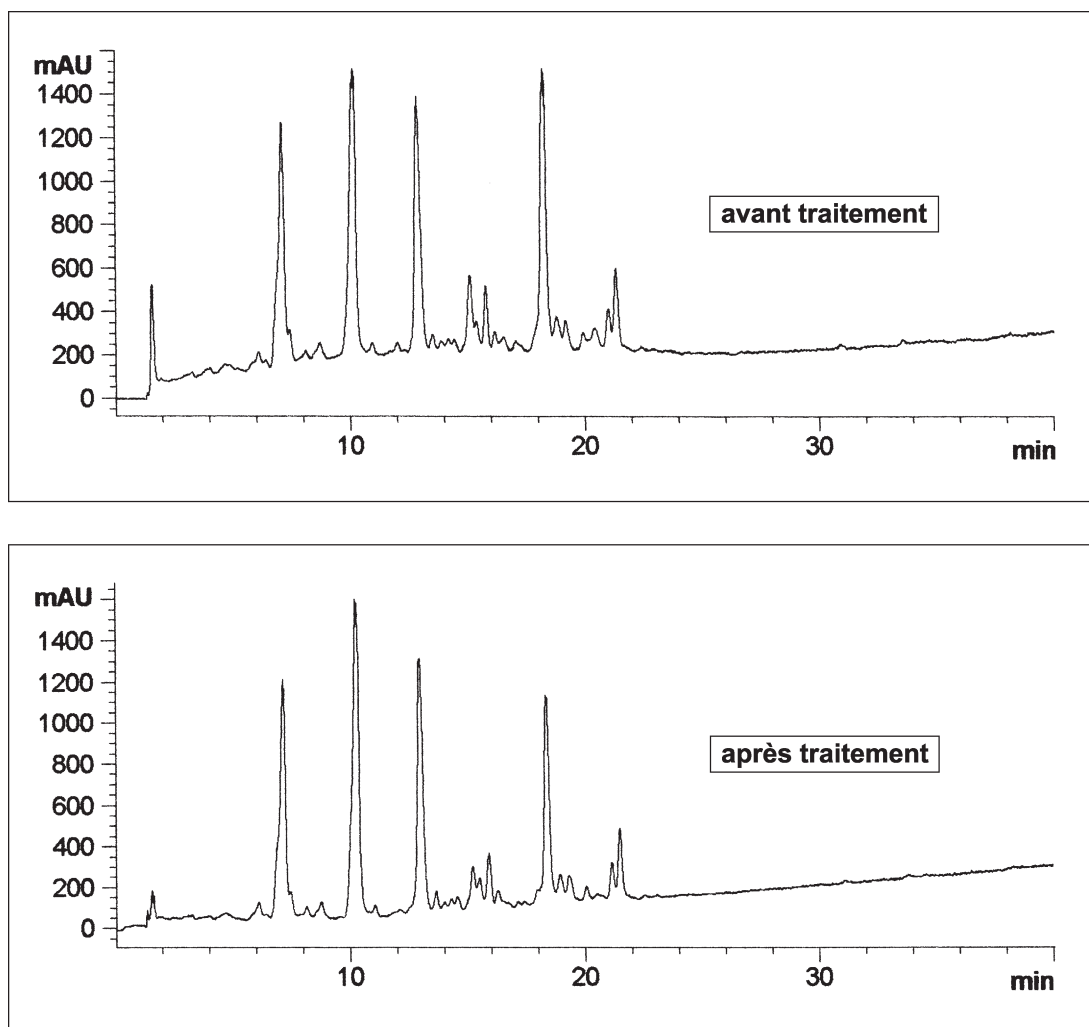
textes arabes préconisaient l'utilisation d'alun, qui est le sulfate double d'aluminium et de potassium au pouvoir astringent, à cette même fin (Hostettmann, 2000).

L'emploi médicinal de drogues à diterpènes irritants et cytotoxiques n'est pas dénué de danger. Pour preuve, on se rappellera des nombreux emplois non médicaux (chasse, pêche) voire criminels de certaines Thymelaeaceae. De par leurs propriétés protectrices décrites plus tôt, la présence de tanins s'avère donc de première importance dans le domaine des effets secondaires induits par ces substances de manipulation délicate. Si l'on considère encore les propriétés antiseptiques clairement démontrées des tanins (Bruneton, 1999), on peut conclure que leur présence dans *G. involucrata* en rend l'utilisation externe moins délicate. Ce qui précède peut également s'appliquer aux autres Thymelaeaceae, pour autant qu'elles contiennent aussi des quantités comparables de tanins et qu'il y ait un bon équilibre avec la teneur en diterpènes irritants. Cette problématique met encore un fois l'accent sur la difficulté d'utiliser des plantes ou parties de plantes sous forme non standardisée !

3.4.4 Elimination des tanins

Dans l'optique du présent travail, les tanins empêchent une bonne résolution des chromatogrammes LC/DAD-UV, comme on peut le voir sur les tracés bombés présentés sous 3.2.2. Nous avons donc entrepris d'en épurer les extraits méthanoliques de *G. involucrata* avant de débiter leur fractionnement guidé par les données LC/DAD-UV.

La méthode appliquée est celle qui a été décrite par Hostettmann *et al.* (1997). Elle consiste à mélanger 10 g d'extrait avec 100 ml d'éthanol à 25 % et d'agiter pendant 1 h avec 20 g de poudre de peau. La suspension est ensuite filtrée et le solvant évaporé pour obtenir un extrait exempt de tanins. Par cette procédure, nous avons obtenu 6 g d'extrait méthanolique exempt de tanins des parties aériennes et 5 g d'extrait méthanolique exempt de tanins des racines de *G. involucrata*. La Figure 3.3 montre l'efficacité de la procédure avec l'exemple de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *G. involucrata*, dont le chromatogramme LC/UV a une allure sensiblement améliorée.



**Figure 3.3 – Chromatogrammes LC/DAD-UV à 210 nm de l’extract méthanolique des parties aériennes de *Gnidia involucrata* avant et après traitement à la poudre de peau.
Conditions expérimentales décrites sous 3.2.1.**

3.4.5 Fractionnement de l’extract méthanolique des parties aériennes

Une prise de 6 g d’extract méthanolique exempt de tanins des parties aériennes de *G. involucrata* a d’abord été séparée sur colonne ouverte (60 x 4,5 cm) de Silicagel 60 (230-400 μm) avec une élution en gradient par palier. Les mélanges $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ suivants ont été utilisés successivement : 80:20:1 (3 l), 70:30:1 (2 l), 60:40:1 (1 l), 50:50:1 (1 l) et

20:80:1 (1 l). La phase stationnaire a ensuite été lixiviée avec 4 l de MeOH. L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par TLC et il en a résulté 10 fractions (A-J).

La fraction D (650 mg) a été filtrée sur colonne de Sephadex LH-20 (50 x 3 cm ; MeOH-H₂O 5:1), pour donner les composés **B** (225 mg) et **E** (15 mg). L'évaporation à température ambiante de la fraction F a permis la cristallisation du composé **F** (20 mg). La fraction G (500 mg) a été séparée sur colonne de Silicagel 60 (50 x 4 cm) à l'aide du mélange CHCl₃-MeOH-H₂O 65:35:5 (1,5 l), puis de MeOH (0,5 l) pour donner le composé **A** (80 mg) (Figure 3.4).

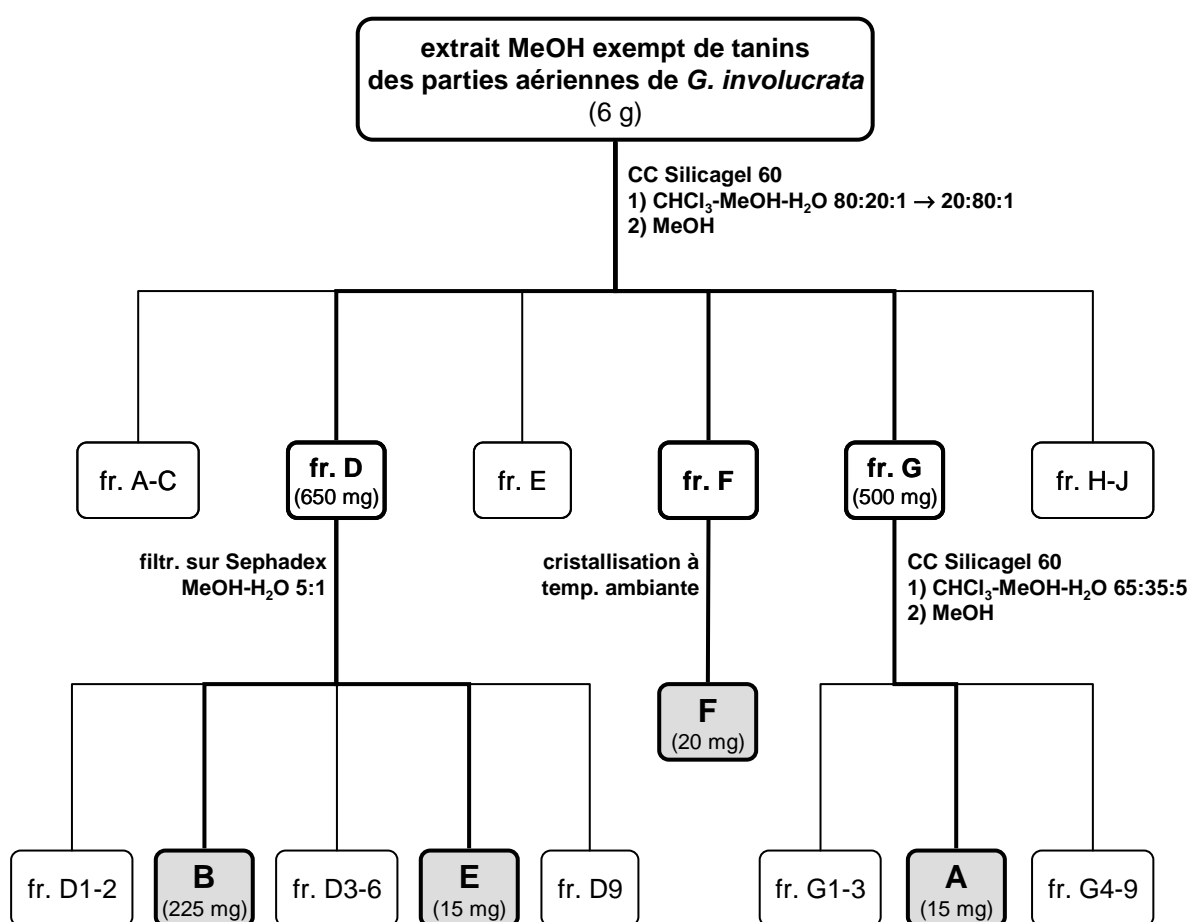


Figure 3.4 – Schéma d'isolement des composés A-B et E-F de l'extrait méthanolique exempt de tanins des parties aériennes de *G. involucrata*.

Une autre portion d'extract méthanolique exempt de tanins des parties aériennes de *G. involucrata* (1 g) a été fractionnée par chromatographie à basse pression (LPLC) sur une colonne Lobar LiChroprep RP-18 (310 x 25 mm) avec une élution en gradient par palier : MeOH-H₂O 30:70 (1,3 l), 40:60 (0,8 l) et enfin 70:30 (0,5 l) à un débit de 3 ml/min. Cette séparation a conduit au composé **C** (80 mg) et à 7 fractions (K-Q).

La filtration sur colonne Sephadex (45 x 3 cm ; MeOH) de la fraction P (360 mg) a donné 4 fractions (P1-4) et le composé **D** (150 mg) (Figure 3.5).

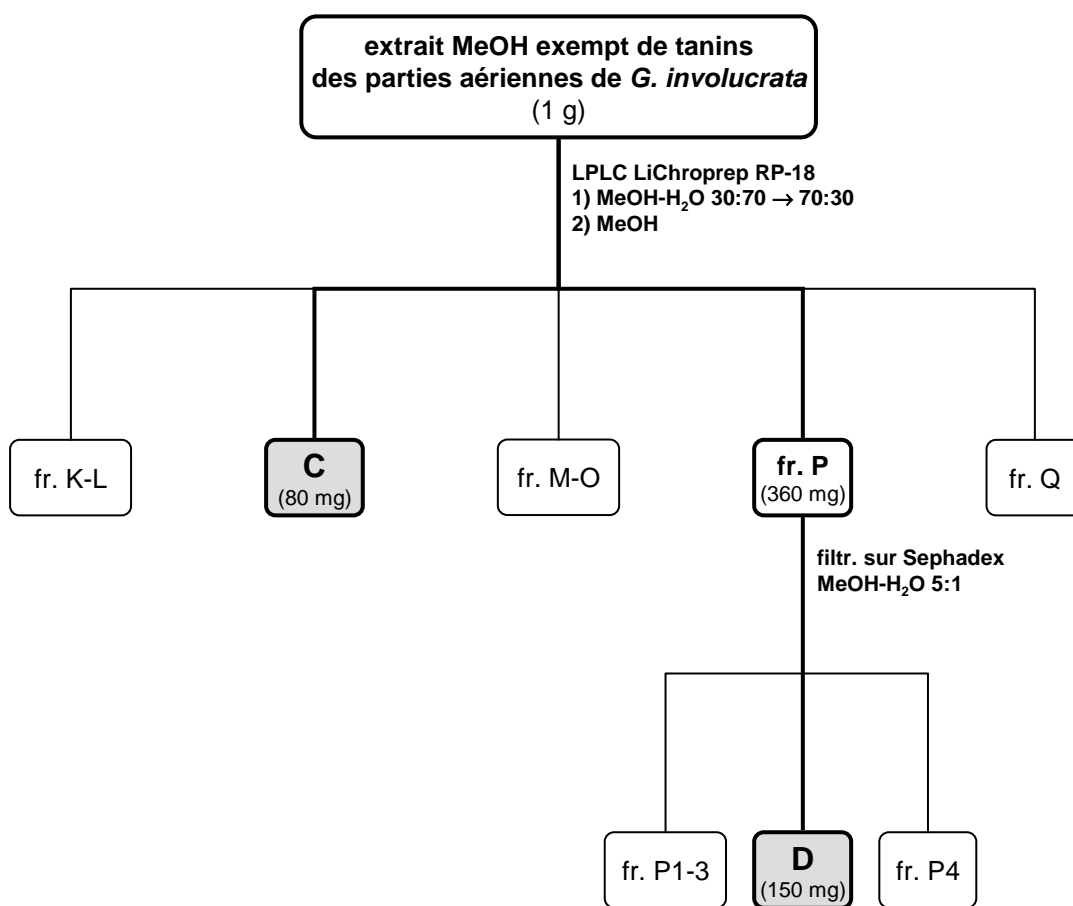


Figure 3.5 – Schéma d'isolement des composés C et D de l'extract méthanolique exempt de tanins des parties aériennes de *G. involucrata*.

La Figure 3.6 présente les positions de ces 6 composés dans le chromatogramme de l'extrait brut fractionné, déterminées par des analyses LC/DAD-UV, dans les mêmes conditions que précédemment, de l'extrait dopé.

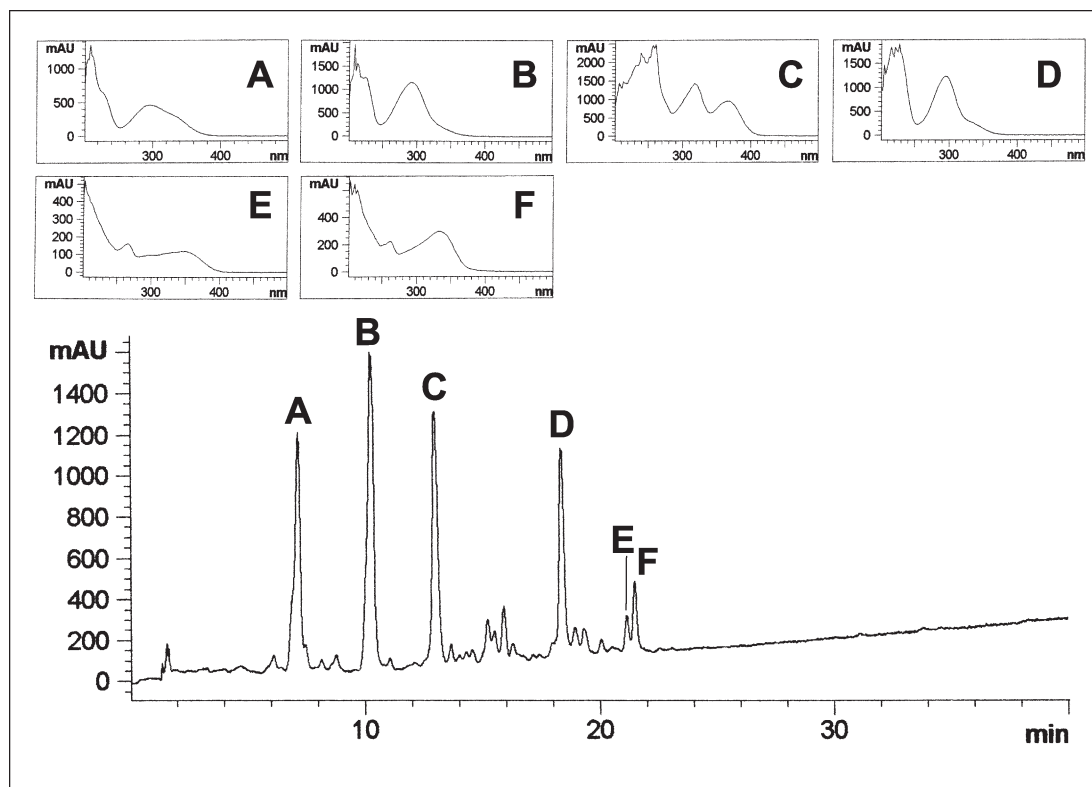


Figure 3.6 – Chromatogramme LC/DAD-UV à 210 nm et spectres enregistrés *on-line* des composés isolés dans les parties aériennes de *Gnidia involucrata*. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.1.

3.4.6 Fractionnement de l'extrait méthanolique des racines

Une prise de 7 g d'extrait méthanolique exempt de tanins des racines de *G. involucrata* a d'abord été séparée par chromatographie à moyenne pression (MPLC) sur une colonne LiChroprep RP-18 (450 x 40 mm) avec une élution en gradient à un débit de 6 ml/min. La composition du mélange d'élution MeOH-H₂O a évolué de la manière suivante : 5:95 → 30:70 en 4 h, 30:70 → 50:50 en 8 h, 50:50 → 70:30 en 8 h et 70:30 → 100:0 en 2 h. La phase

stationnaire a ensuite été lixiviée avec du MeOH seul pendant 2 h. L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par TLC et il en a résulté 10 fractions (A-J).

La fraction F (2700 mg) été ensuite séparée par MPLC sur une colonne LiChrorep RP-18 (450 x 30 mm) avec une élution en gradient à un débit de 5 ml/min. La composition du mélange d'élution MeOH-H₂O a évolué de 5:95 à 20:80 en 22 h, puis est restée stable dans ces proportions pendant 4 h. L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par TLC et il en a résulté 12 fractions (F1-F12).

La fraction F9 (240 mg) a été à son tour séparée par MPLC sur une colonne LiChrorep RP-18 (500 x 30 mm) avec une élution en gradient à un débit de 5 ml/min. La composition du mélange d'élution MeOH-H₂O a évolué de la manière suivante : 10:90 pendant 2 h, 10:90 → 60:40 en 5 h et 60:40 → 100:0 en 4 h. La phase stationnaire a ensuite été lixiviée avec du MeOH seul pendant 2 h. L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par TLC et il en a résulté 5 fractions (F9a-F9e) et le composé **G** (30 mg) (Figure 3.7).

Le composé **D**, isolé des parties aériennes de *G. involucrata* a posé des problèmes de détermination de structure, car il s'agissait en fait d'un mélange de diastéréoisomères difficilement séparables. D'après la Figure 3.1, il semblait être présent dans les racines de la même plante en plus grandes quantités, ce qui permettait d'approfondir les analyses structurales nécessaires.

Pour ré-isoler le composé **D** des racines de *G. involucrata*, la fraction G obtenue plus haut (1680 mg) été séparée sur colonne ouverte (50 x 4 cm) de Silicagel 60 (35-70 µm) avec une élution en gradient par palier. Les mélanges CHCl₃-MeOH suivants ont été utilisés successivement : 70:25 (1,5 l), 65:35 (0,5 l) et 40:60 (0,5 l). La phase stationnaire a ensuite été lixiviée avec 1 l de MeOH. L'évolution de la séparation sur colonne a été suivie par TLC et il en a résulté 8 fractions (G1-8) et le composé **D** (280 mg) (Figure 3.7).

La Figure 3.8 présente les positions de ces 2 composés dans le chromatogramme de l'extrait brut fractionné, déterminées par des analyses LC/DAD-UV, dans les mêmes conditions que

précédemment, de l'extrait dopé. De plus, elle met en évidence les composés **C** et **F** qui ont été isolés des parties aériennes.

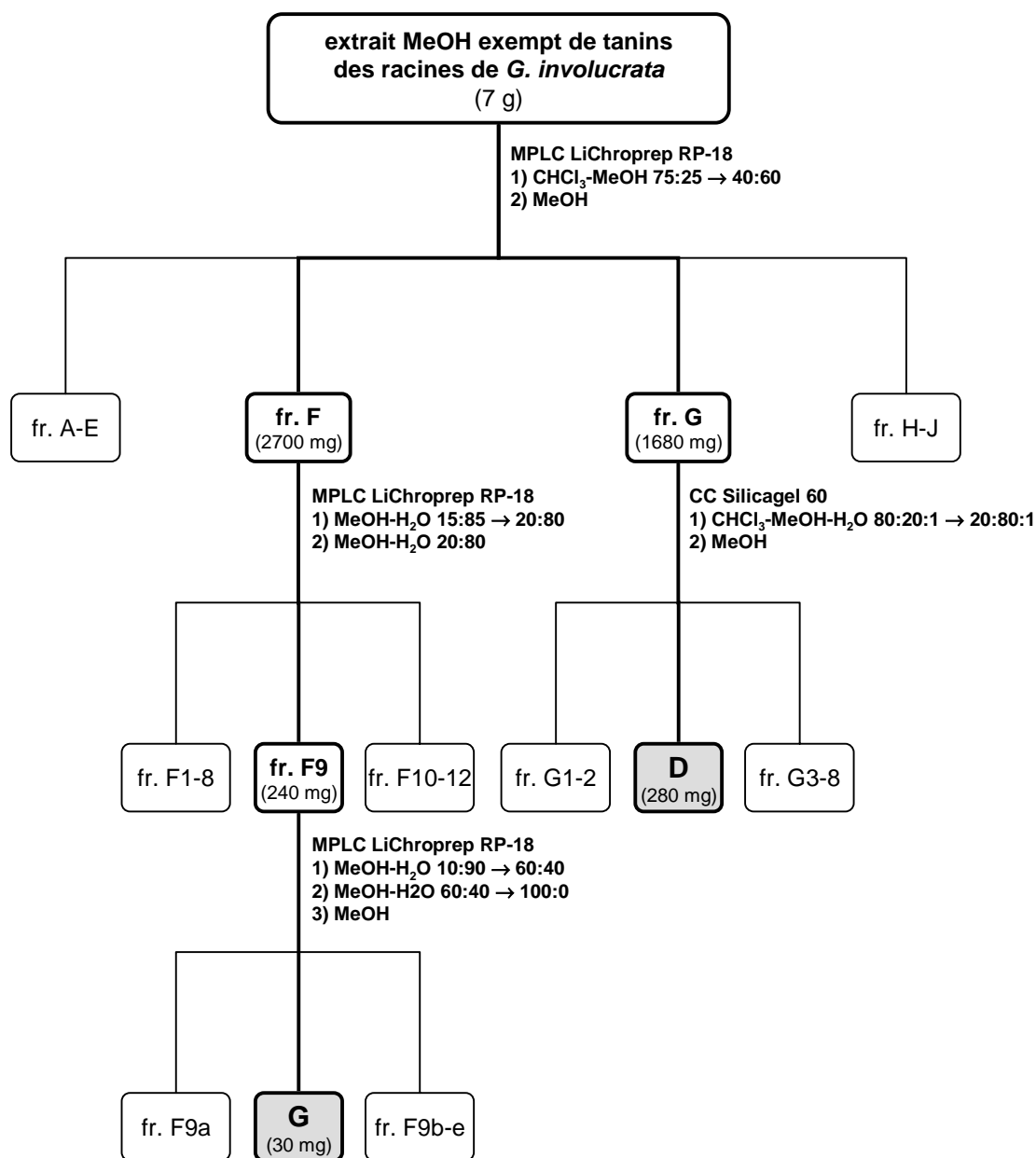


Figure 3.7 – Schéma d'isolement des composés **D** et **G** de l'extrait méthanolique exempt de tanins des racines aériennes de *G. involucrata*.

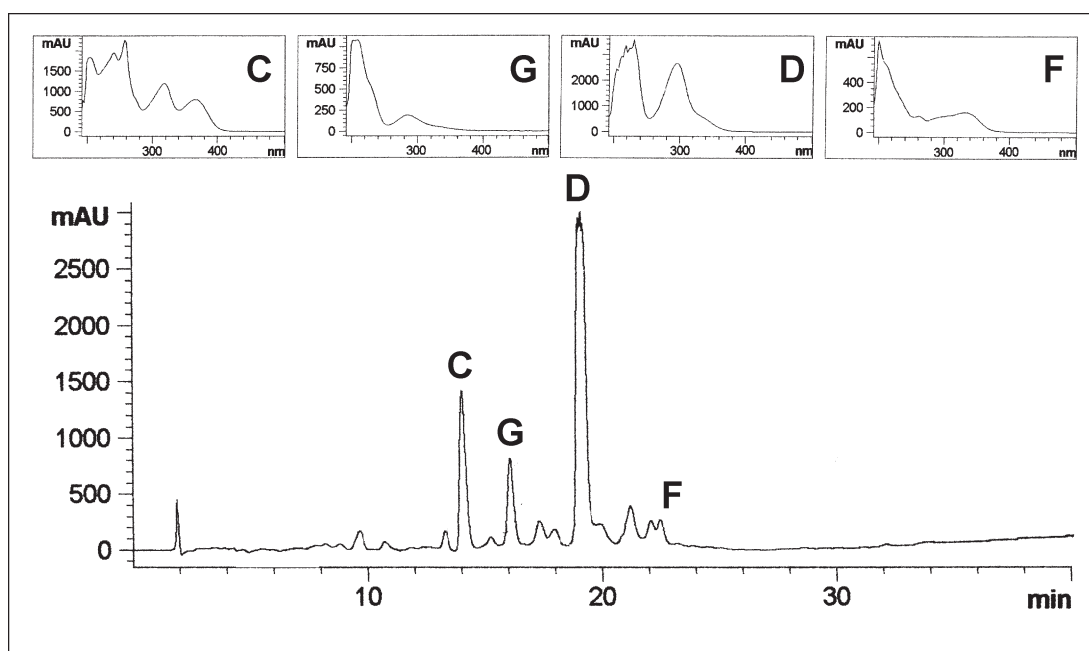


Figure 3.8 – Chromatogramme LC/DAD-UV à 210 nm et spectres enregistrés *on-line* des composés isolés ou caractérisés dans les racines de *Gnidia involucrata*. Conditions expérimentales décrites sous 3.2.1.

3.4.7 Détermination de structure des composés A-G

3.4.7.1 Composé A

Ce composé se présente sous forme d'une fine poudre jaune clair. Bien que son spectre UV-visible (*cf.* Figure 3.6) se rapproche de ceux observés chez les flavonoïdes (Markham, 1982), il ne réagit pas avec le réactif NST/PEG. La formule brute $C_{19}H_{20}O_{11}$ du composé **A** a été établie sur la base d'analyses par spectrométrie de masse (APCI-, D/CI- et EI-MS) et de résonance magnétique nucléaire (1H - et ^{13}C -NMR).

Cependant, les spectres de masse EI et D/CI ne permettent pas à eux seuls de déduire une masse moléculaire de 424 Da. Pour commencer, le spectre D/CI-MS en mode positif (Figure 3.9), obtenu par une méthode d'ionisation dite douce, ne montre qu'un pic à m/z 408. Celui-ci ne peut pas correspondre à un adduit de l'ion moléculaire, car une masse paire aurait signifié la présence d'un nombre impair d'atomes d'azote (Silverstein *et al.*, 1998), alors que les

analyses structurales ultérieures permettent de conclure à leur absence. Le fragment à m/z 408 doit donc être issu du départ d'un groupe hydroxyle (17 Da).

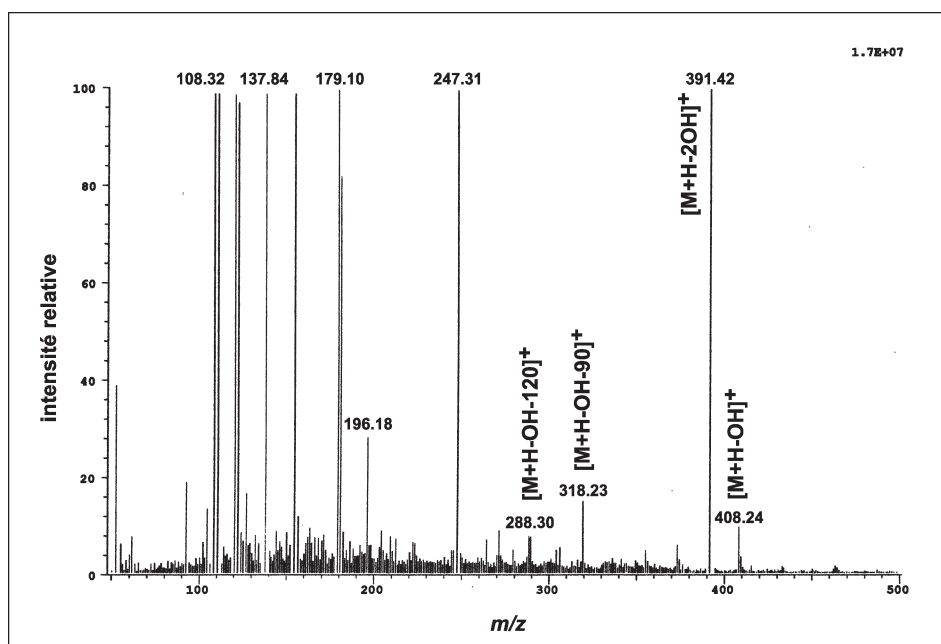


Figure 3.9 – Spectre D/CI-MS en mode d'ionisation positive du composé A.

Le spectre D/CI-MS montre également des ions à m/z 318 ($[M+H-OH-90]^+$) et m/z 288 ($[M+H-OH-120]^+$), correspondant à une fragmentation typique des C-glycosides (Rath *et al.*, 1995) (Figure 3.10).

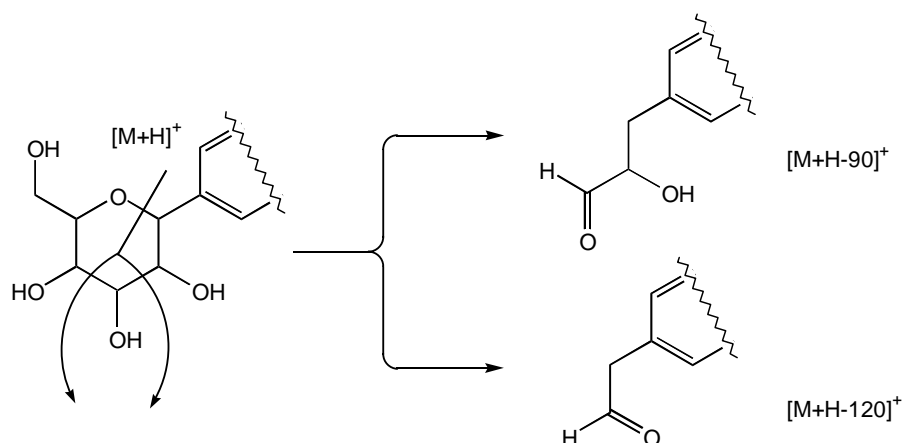


Figure 3.10 – Schéma de fractionnement D/CI caractéristique pour des C-glycosides (Rath *et al.*, 1995).

Le spectre EI-MS (Figure 3.11) confirme ces observations. En effet, on retrouve un pic à m/z 390, correspondant à l'ion $[M-2OH]^+$. Les départs de fragments de 90 Da et 120 Da sont à nouveau mis en évidence sur les ions $[M-OH]^+$ et $[M-2OH]^+$.

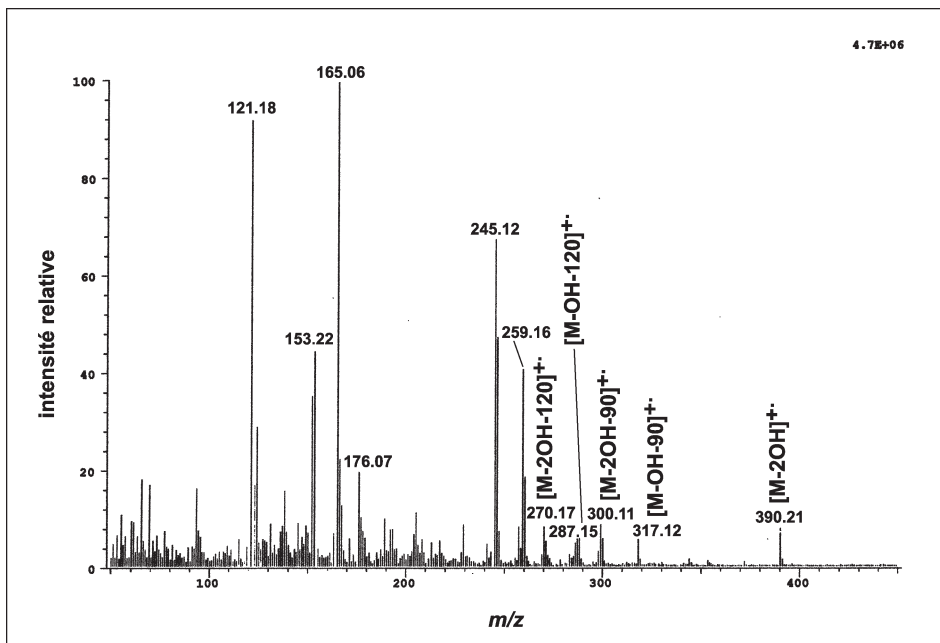


Figure 3.11 – Spectre EI-MS du composé A.

Même avec une méthode d'ionisation douce comme l'ionisation chimique, il n'a pas été possible de mettre en évidence l'ion moléculaire afin de prouver la formule brute $C_{19}H_{20}O_{11}$. Pour contourner le problème de la labilité des groupes OH, nous avons donc entrepris l'acétylation du composé **A** (cf. 5.7.1). Une analyse APCI-MS en mode d'ionisation positive a ensuite été menée sur le composé **A** nona-acétylé, dont le spectre est présenté en Figure 3.12. Il y apparaît clairement l'ion de la molécule protonée à m/z 803, ce qui correspond à la masse du composé **A** (424 Da) additionnée de 9 groupes acétyles ($9 \times 42 \text{ Da} = 378 \text{ Da}$). Les pics à m/z 761, m/z 719, m/z 677 et m/z 635 représentent les départs respectifs de 1, 2, 3 et 4 groupes acétyles.

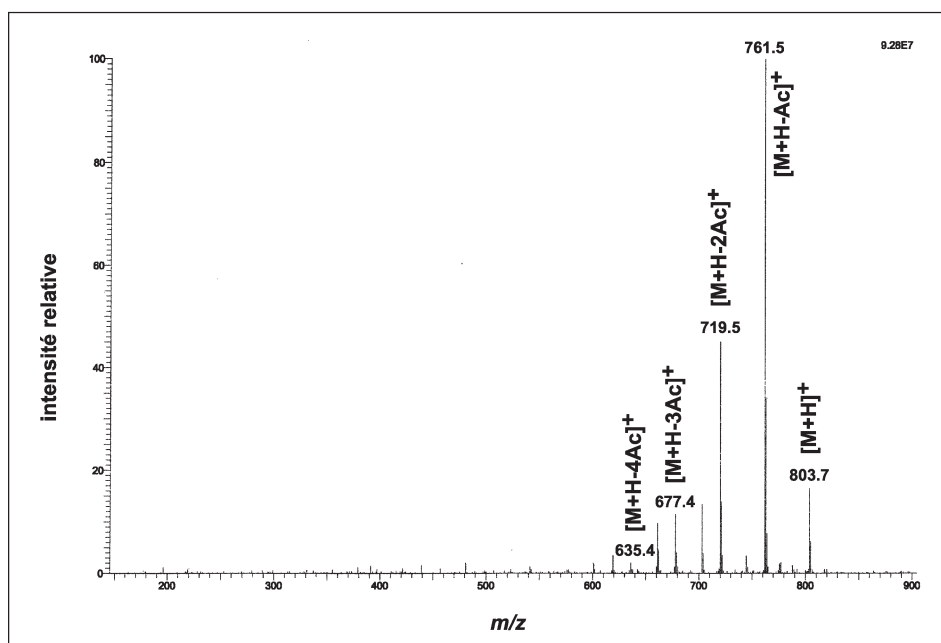


Figure 3.12 – Spectre APCI-MS en mode d'ionisation positive du composé A nona-acétylé.

Le spectre ^1H -NMR dans le $\text{MeOH-}d_4$ (Figure 3.13) montre deux doublets à δ 7,60 ($J = 9,0$ Hz) et δ 6,77 ($J = 9,0$ Hz), intégrant chacun pour 2 protons. Il s'agit d'un système A_2X_2 de 2 paires de protons aromatiques couplés en *ortho*, suggérant la présence d'un noyau aromatique symétrique.

Le spectre ^{13}C -NMR dans le $\text{MeOH-}d_4$ (Figure 3.14) présente un signal à δ 198,91, un déplacement chimique à bas champs attribuable à un groupe carbonyle de benzophénone (Tanaka *et al.*, 1984). On y voit également des signaux correspondant à 12 carbones aromatiques, dont certains sont superposés : δ 162,8 (2 C), δ 161,2 (1 C), δ 160,8 (2 C), δ 133,2 (1 C), δ 132,8 (2 C), δ 115,8 (2C), δ 107,2 (1 C) et δ 104,6 (1 C). Les degrés de substitution des différents carbones de la molécule sont donnés grâce aux sous-spectres DEPT de la même figure.

Les données qui précèdent sont cohérentes avec l'hypothèse d'une structure de type benzophénone, avec un second cycle aromatique entièrement substitué.

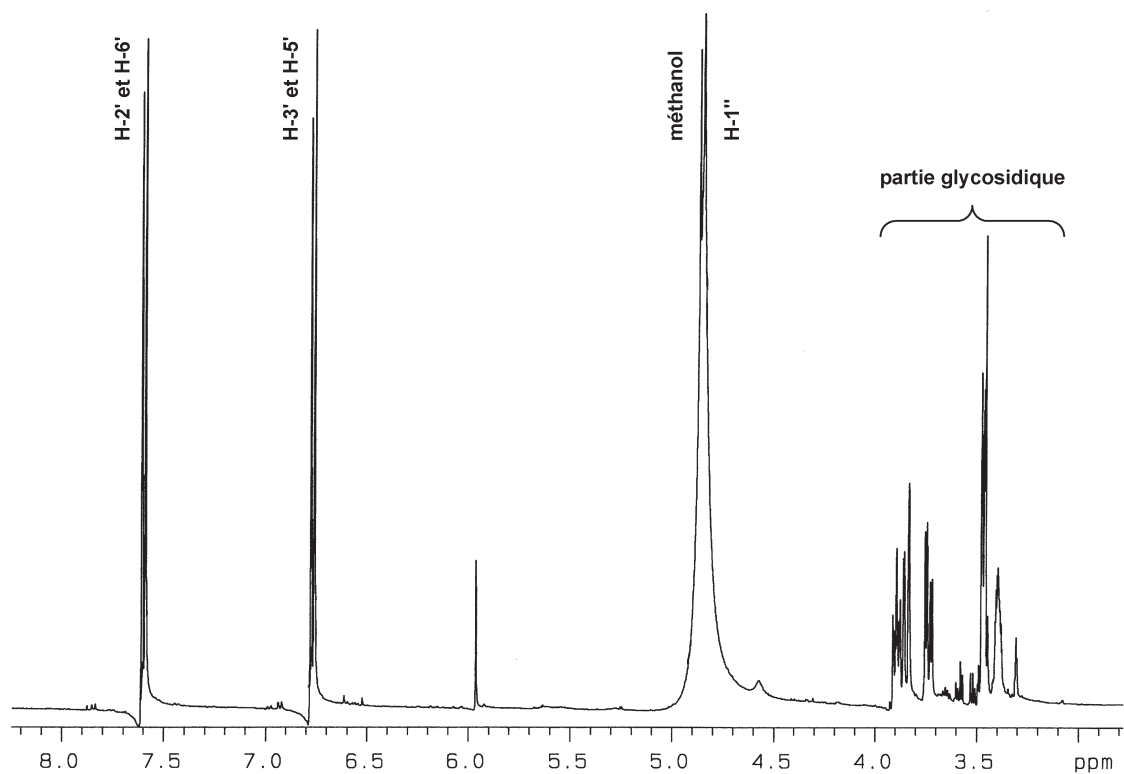


Figure 3.13 – Spectre ^1H -NMR (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé A.

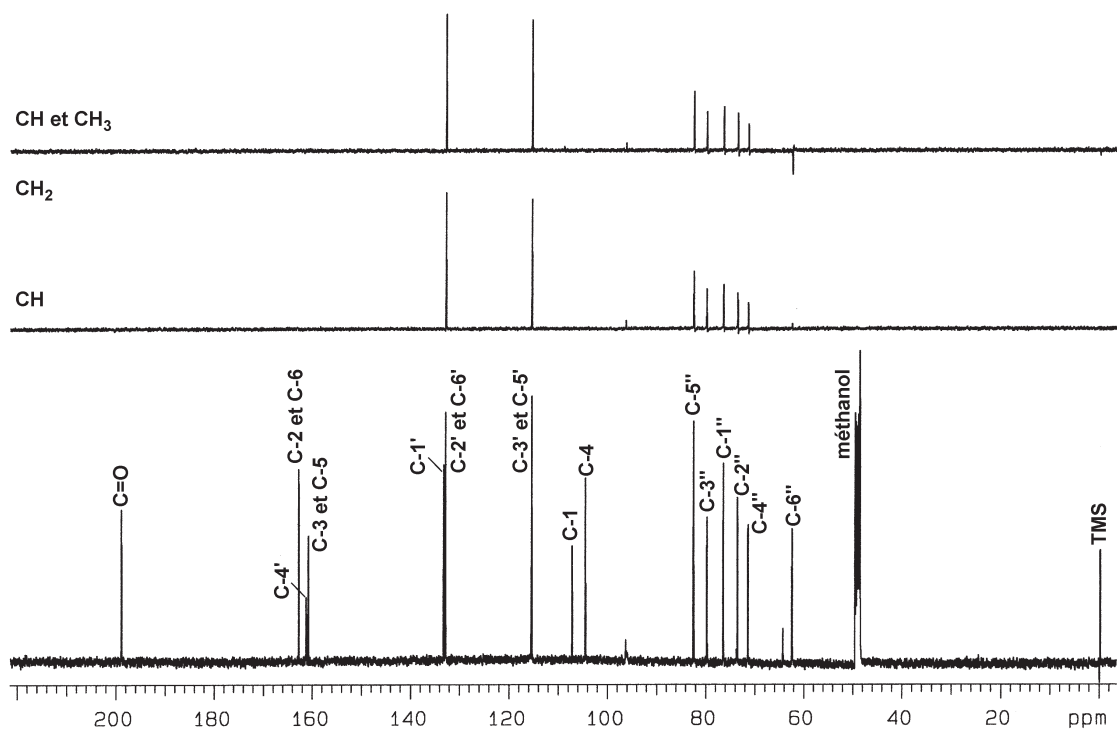


Figure 3.14 – Spectre ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) et sous-spectres DEPT du composé A.

Le spectre ^1H -NMR (Figure 3.13) montre un doublet, quelque peu masqué par le signal du solvant, à δ 4,86 ($J = 8,0$ Hz). Ce signal est caractéristique du proton anomérique d'un β -glucose (Agrawal, 1992), dont le spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC (Figure 3.15) nous dit qu'il est lié à un carbone à δ 76,5. Ce dernier déplacement chimique est rencontré dans les C-glucosides (Markham, 1982), ce qui confirme notre hypothèse de départ.

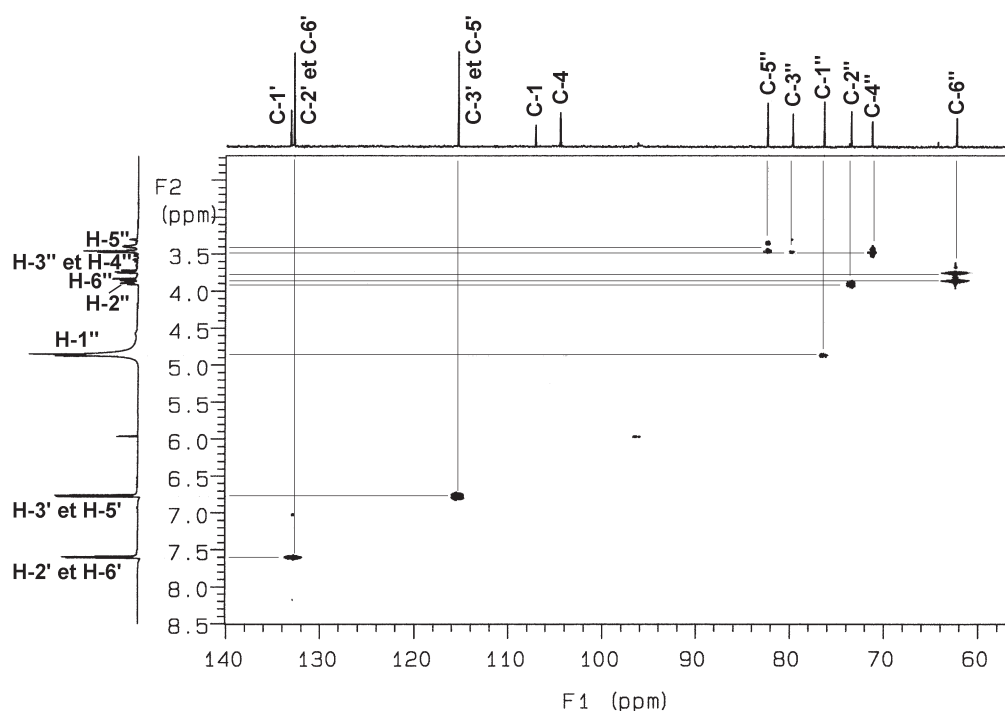


Figure 3.15 – Spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC du composé A.

Une corrélation hétéronucléaire HMBC sans ambiguïté (Figure 3.16) entre le proton anomérique de l'unité β -glucose et le C-4 du squelette benzophénone a permis de confirmer la position d'attache du sucre.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations ^1H - ^{13}C à courte (HSQC ; Figure 3.15) et à longue distance (HMBC ; Figure 3.16) et ^1H - ^1H (COSY ; Figure 3.17).

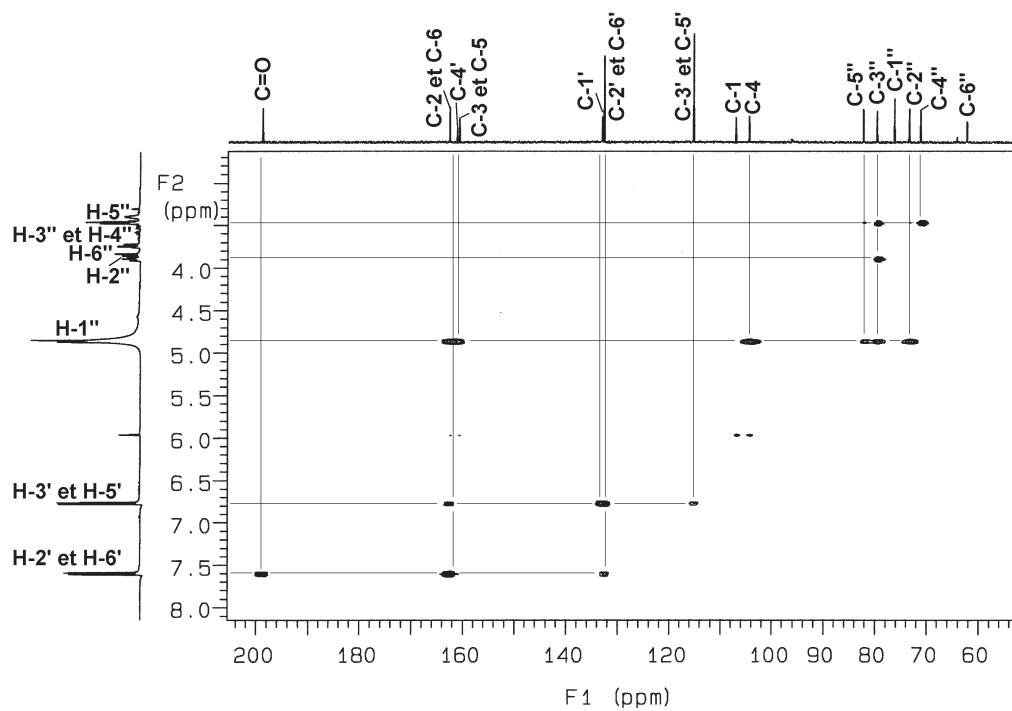


Figure 3.16 – Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé A.

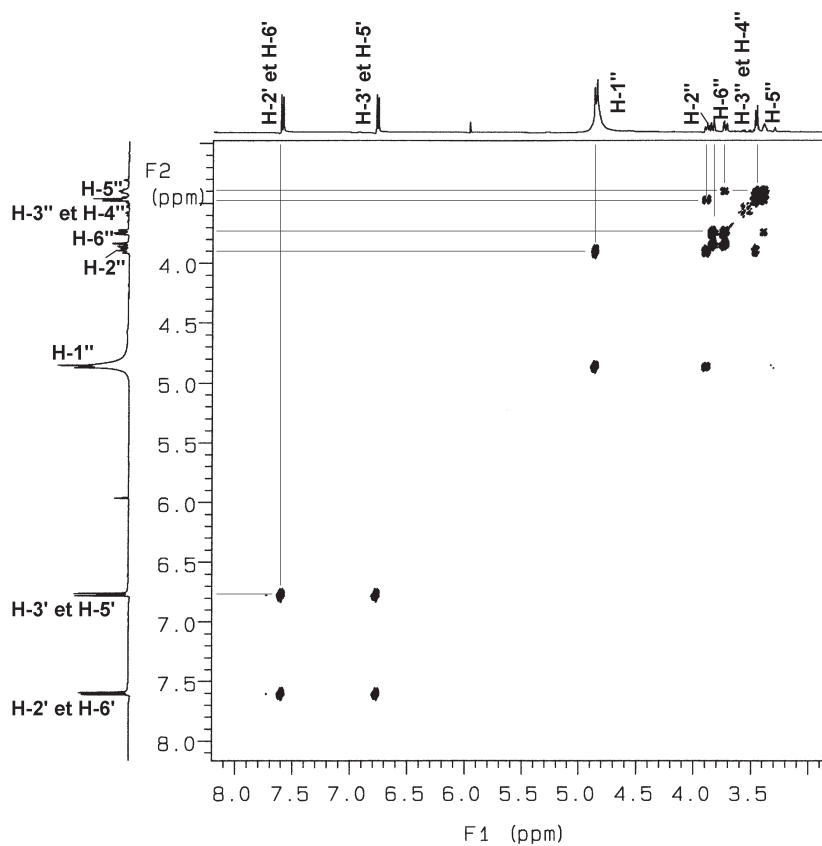
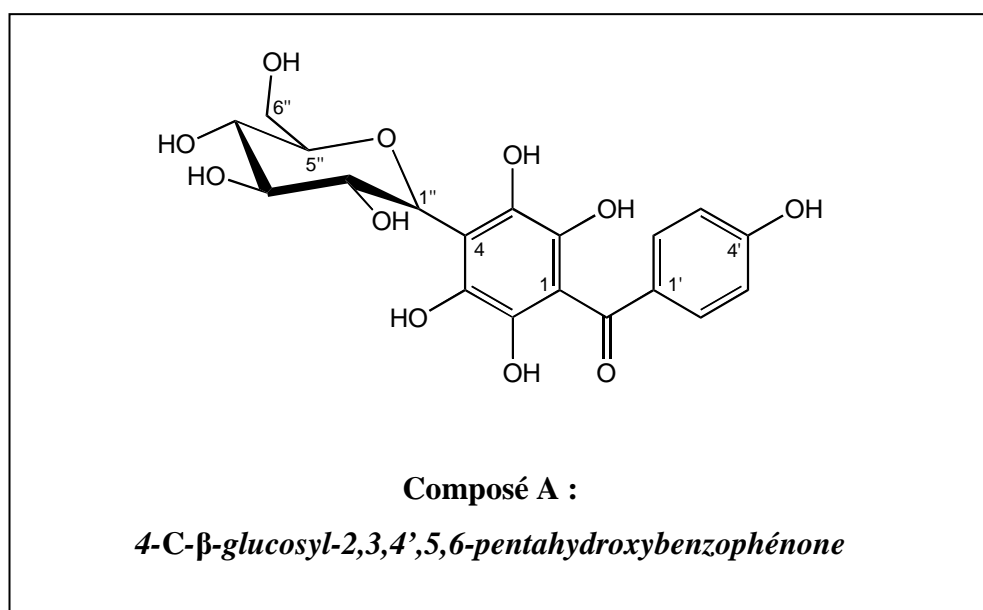


Figure 3.17 – Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé A.

Au vu des données exposées précédemment, le composé **A** a été identifié de manière univoque comme étant la 4-*C*- β -glucosyl-2,3,4',5,6-pentahydroxybenzophénone, un nouveau composé naturel. Il est d'ailleurs intéressant de constater que c'est la première fois qu'une benzophénone est mise en évidence dans une Thymeleaceae. Qui plus est, il s'agit d'un isomère de structure de la 3-*C*- β -glucosylmaclurine, le précurseur biosynthétique de la mangiférine (Franz et Grün, 1983).



3.4.7.2 Composé B

Ce produit pur est une fine poudre jaune clair, dont le spectre UV-visible est similaire à celui du composé **A** (cf. Figure 3.6), suggérant à nouveau une structure de type benzophénone. La formule brute $C_{20}H_{22}O_{10}$ du composé **B** a été établie sur la base d'analyses par spectrométrie de masse (D/CI- et EI-MS) et de résonance magnétique nucléaire (1H - et ^{13}C -NMR).

Le spectre D/CI-MS en mode positif (Figure 3.18) montre des pics correspondant à des adduits de l'ion moléculaire à m/z 440 ($[M+NH_4]^+$) et m/z 423 ($[M+H]^+$) et un fragment à m/z 261 ($[M+H-162]^+$), caractéristique de la perte d'une unité *O*-hexosyle.

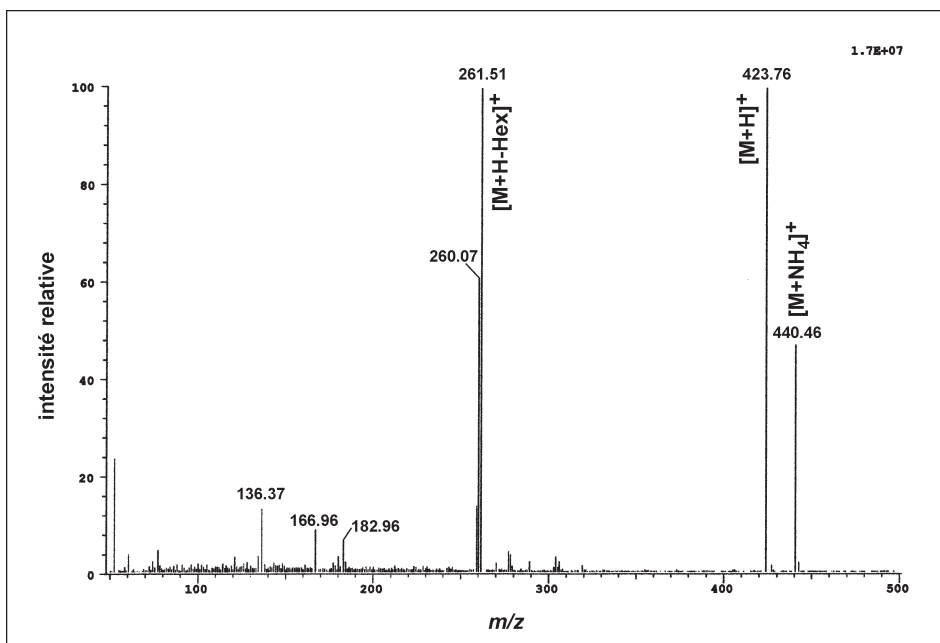


Figure 3.18 – Spectre D/CI-MS en mode d'ionisation positive du composé B.

Le spectre EI-MS (Figure 3.19) confirme la perte de cette unité glycosidique avec un pic à m/z 260, correspondant à l'ion $[M-162]^+$.

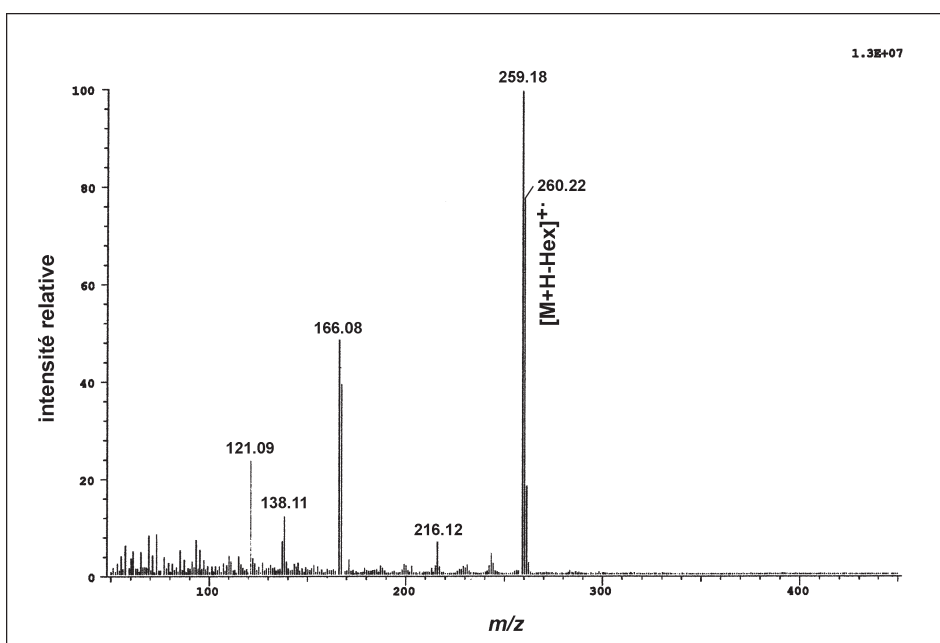


Figure 3.19 – Spectre EI-MS du composé B.

Sur le spectre ^1H -NMR dans le $\text{MeOH-}d_4$ (Figure 3.20) apparaissent des signaux déblindés à δ 7,69 ($J = 9,0$ Hz) et δ 6,78 ($J = 9,0$ Hz), intégrant chacun pour 2 protons et suggérant la présence du même cycle phénolique *para*-substitué que dans le composé **A**. Les protons aromatiques de l'autre cycle montrent deux doublets à δ 6,39 ($J = 2,0$ Hz) et δ 6,17 ($J = 2,0$ Hz), dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *mé*ta.

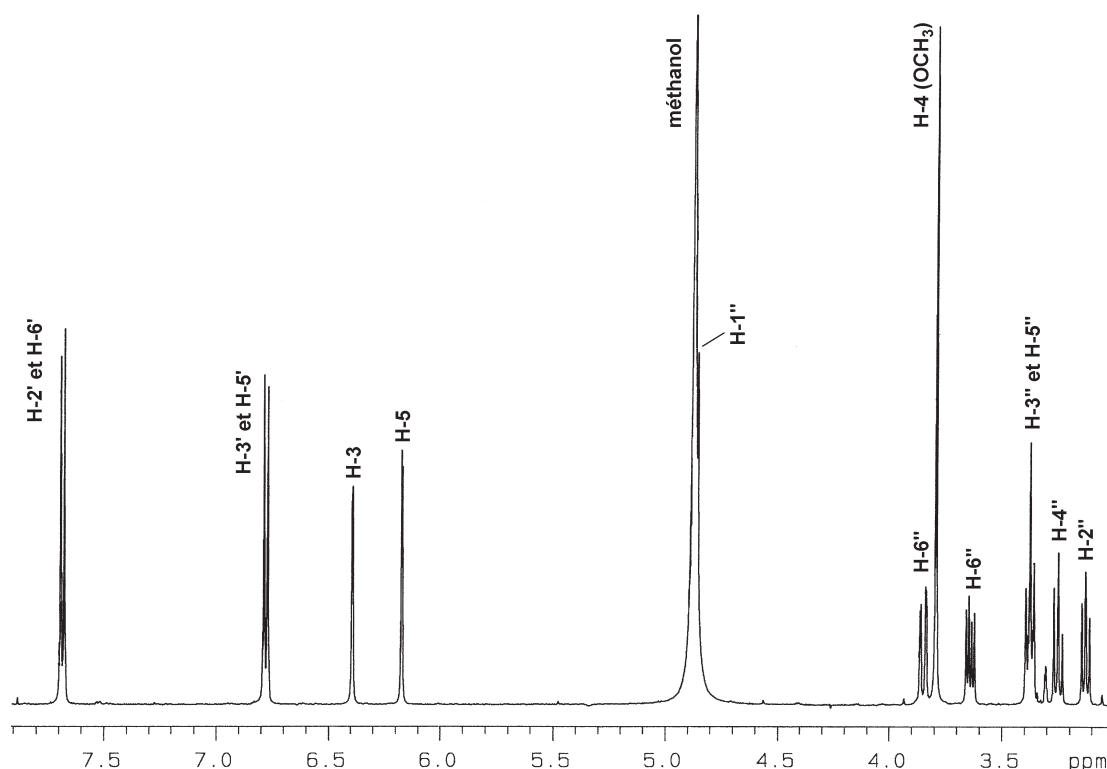


Figure 3.20 – Spectre ^1H -NMR (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé **B**.

Les spectres ^1H -NMR (Figure 3.20) et ^{13}C -NMR (Figure 3.21) suggèrent la présence d'un groupe méthoxyle, de par un singulet à δ 3,79 intégrant pour 3 protons et un signal ^{13}C à δ 55,2 (Pretsch *et al.*, 2000).

Le spectre ^{13}C -NMR dans le $\text{MeOH-}d_4$ (Figure 3.21) montre un signal à δ 196,3, caractéristique de la présence d'un groupe carbonyle conjugué (Tanaka *et al.*, 1984) et 12 signaux de carbones aromatiques, dont ceux à δ 132,9 et δ 115,3 représentent chacun une paire de carbones magnétiquement équivalents.

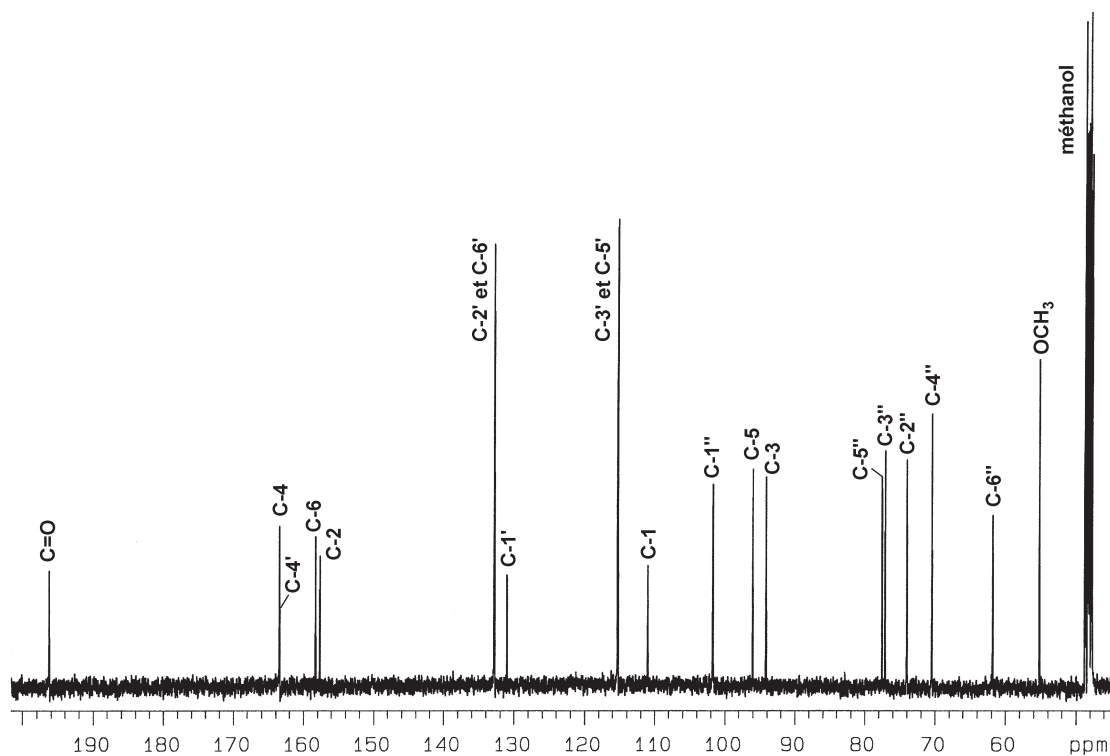


Figure 3.21 – Spectre ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé B.

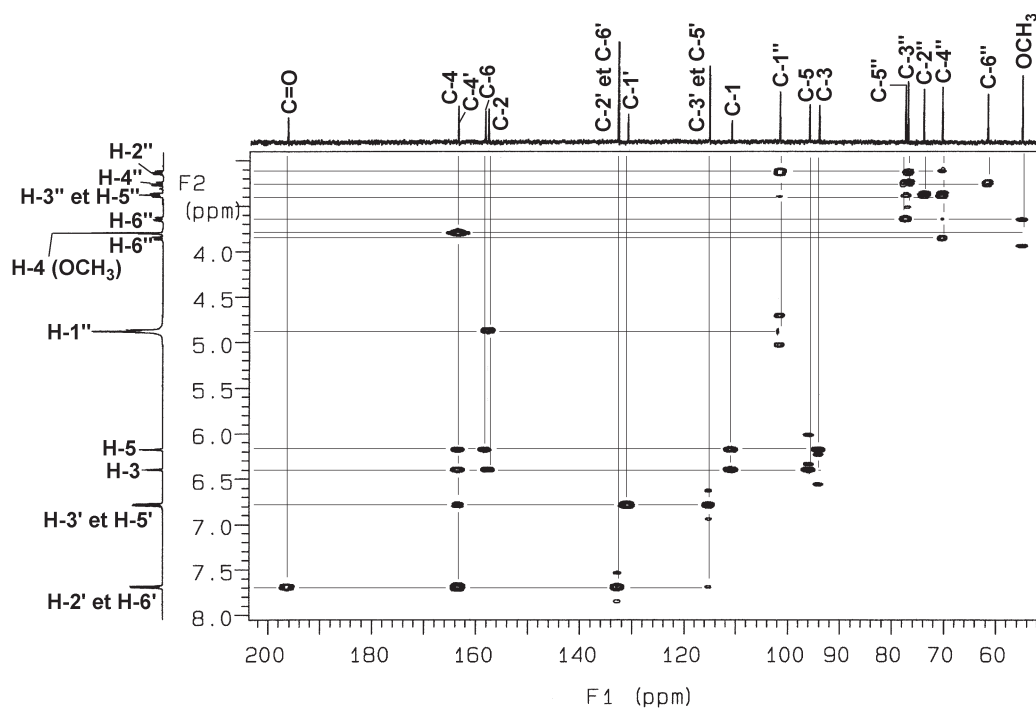


Figure 3.22 – Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé B.

Le spectre ^1H -NMR (Figure 3.20) montre un doublet à δ 4,86 ($J = 8,0$ Hz), typique du proton anomérique d'une unité β -glucose (Agrawal, 1992). Une corrélation hétéronucléaire HSQC (Figure 3.23) permet de définir le carbone porteur de ce proton avec un signal à δ 101,8, déplacement chimique rencontré dans les *O*-glucosides (Markham, 1982). La position d'attache du sucre en C-2 a été révélée grâce à l'expérience HMBC (Figure 3.22) et confirmée par une corrélation homonucléaire NOESY entre le proton anomérique (H-1'') et H-3 (Figure 3.24).

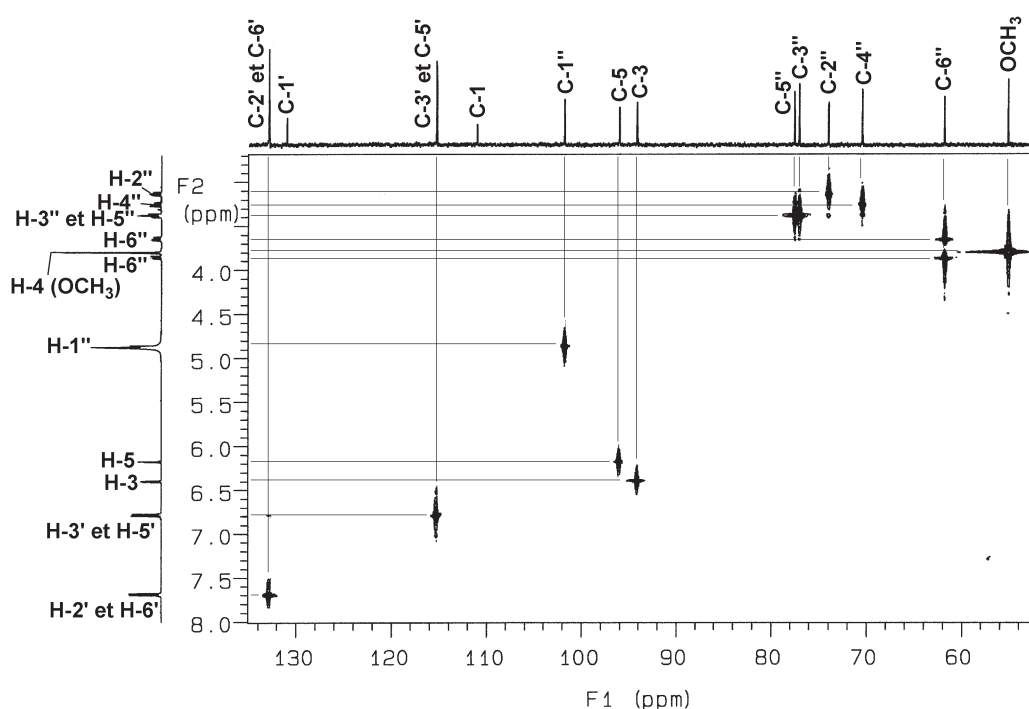


Figure 3.23 – Spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC du composé B.

L'hydrolyse de 1 mg du composé **B** (cf. 5.7.3) a permis, après analyse comparative versus témoin par TLC et révélation au réactif à la diphenylamine, d'identifier formellement le glucose (R_f 0,35, brun-vert).

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations hétéronucléaires HMBC (Figure 3.22) et HSQC (Figure 3.23), et homonucléaires NOESY (Figure 3.24) et COSY (Figure 3.25). Ainsi, la position du groupe méthoxyle en C-4 a été déterminée grâce à des corrélations homonucléaires NOESY observées entre les protons de cette fonction et ceux attachés en positions 3 et 5.

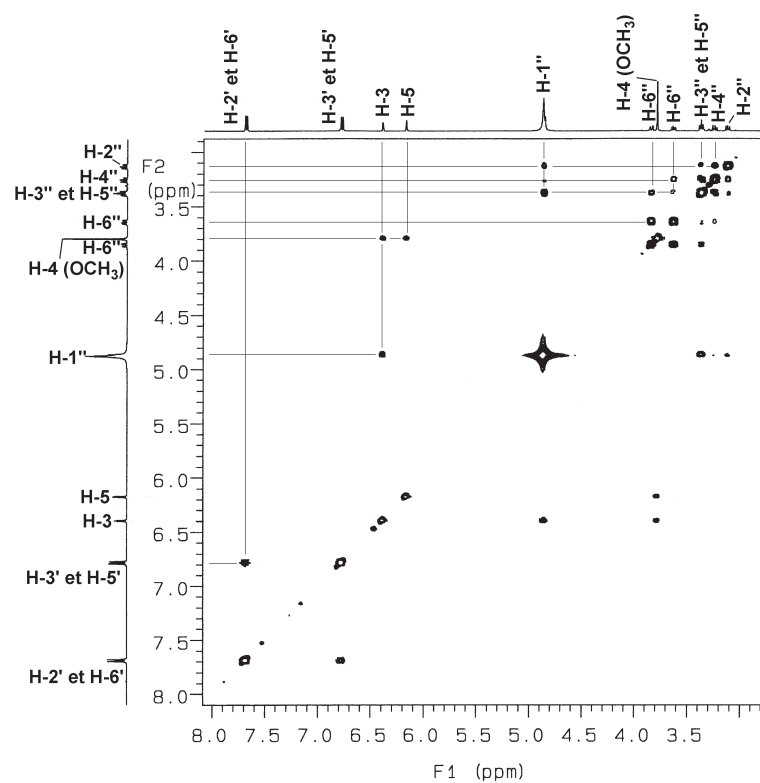


Figure 3.24 – Spectre de corrélations homonucléaires NOESY du composé B.

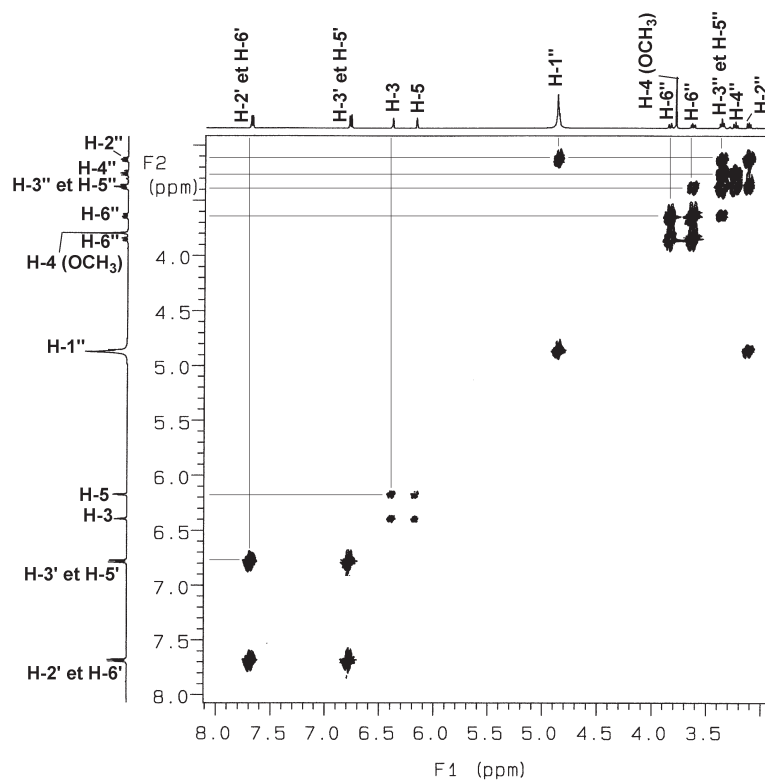
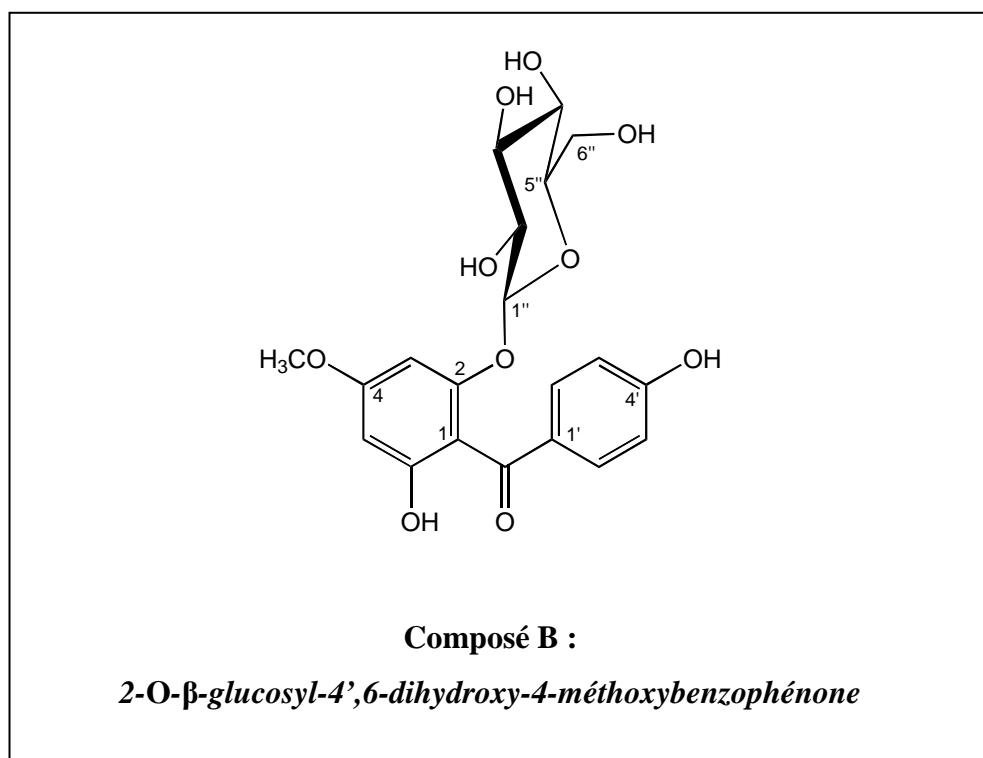


Figure 3.25 – Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé B.

Le composé **B** a donc été identifié comme étant la 2-*O*- β -glucosyl-4',6-dihydroxy-4-méthoxybenzophénone. Il s'agit d'un nouveau composé naturel et du premier *O*-glycoside de benzophénone mis en évidence dans le règne végétal ! Depuis lors, Kitanov et Nedialkov (2001) ont isolé des parties aériennes d'*Hypericum annulatum* Moris (Clusiaceae) la 2'-*O*- β -glucosyl-2,4,5',6-tétrahydroxybenzophénone.



3.4.7.3 Composé C

Ce composé se présente sous la forme d'une poudre d'un jaune intense, dont le spectre UV (*cf.* Figure 3.6) est caractéristique d'une xanthone (Hostettmann et Hostettmann, 1989). La formule brute $C_{19}H_{18}O_{11}$ du composé **C** a été établie sur la base d'analyses par spectrométrie de masse (D/CI- et EI-MS) et de résonance magnétique nucléaire (1H - et ^{13}C -NMR).

Le spectre D/CI en mode positif (Figure 3.26) montre des pics correspondant à des adduits de l'ion moléculaire à m/z 440 ($[M+NH_4]^+$) et m/z 423 ($[M+H]^+$). Des pics correspondant aux fragments issus de la perte de molécules d'eau sont visibles à m/z 405 ($[M+H-H_2O]^+$),

m/z 387 ($[M+H-2H_2O]^+$) et m/z 369 ($[M+H-3H_2O]^+$). On y voit également des ions issus de la perte de fragments de 90 Da et 120 Da à m/z 333 et m/z 303, rappelant la fragmentation caractéristique des C-glycosides présentée dans la Figure 3.10 (Rath *et al.*, 1995).

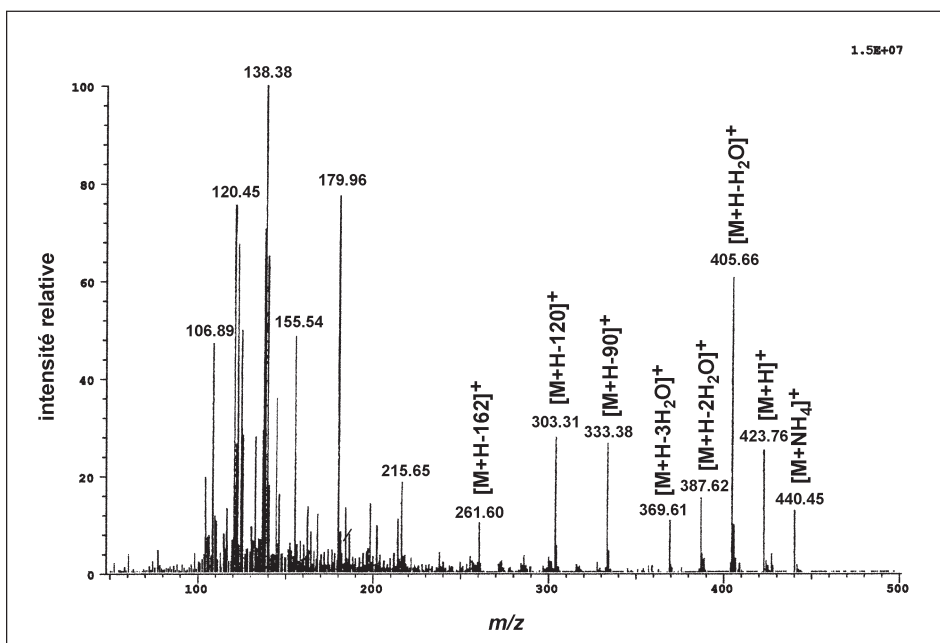


Figure 3.26 – Spectre D/CI-MS en mode d'ionisation positive du composé C.

Sur le spectre EI-MS (Figure 3.27) on distingue le très faible pic moléculaire à m/z 422 ($[M]^+$), mais également des pics plus intenses montrant à nouveau les pertes d'eau : m/z 404 ($[M-H_2O]^+$), m/z 386 ($[M-2H_2O]^+$) et m/z 368 ($[M-3H_2O]^+$). Les pertes de 90 Da et 120 Da sont également visibles avec des pics à m/z 332 ($[M-90]^+$) et m/z 303 ($[M-120]^+$). Le pic de base est situé à m/z 273 ($[M-149]^+$) correspond au cation benzylique de l'aglycone. Le pic à m/z 260 ($[M-162]^+$) est issu de la perte d'un fragment $C_6H_8O_4$ (144 Da) de la molécule monodéhydratée, ce qui peut se résumer en une perte de l'unité glucose et son remplacement par un atome d'hydrogène.

Les différents fragments observés sur les spectres de masse du composé C sont caractéristiques de la fragmentation de la mangiférine, un C-glucoside de xanthone 1,3,6,7 tétrahydroxylée, comme l'a montré Prox (1968). La Figure 3.28 représente une partie du schéma de fragmentation en impact électronique que ce dernier a proposé.

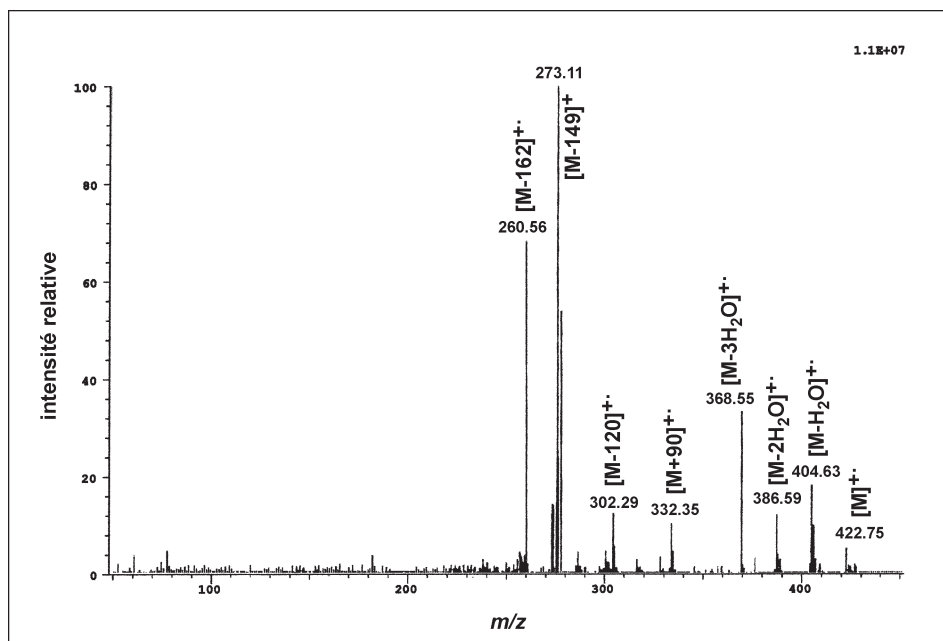


Figure 3.27 – Spectre EI-MS du composé C.

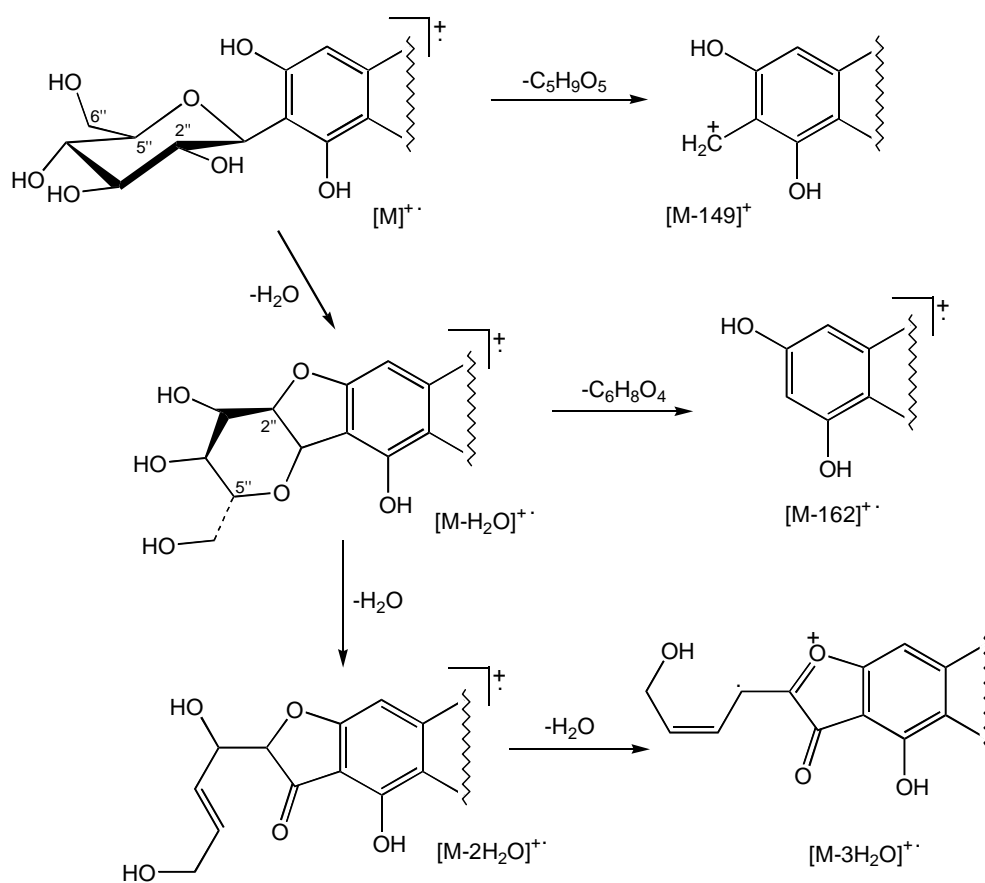


Figure 3.28 – Schéma de fragmentation EI-MS partiel de la mangiférine d'après Prox (1968).

Le spectre ^1H -NMR dans le $\text{DMSO}-d_6$ (Figure 3.29) montre trois singulets à δ 7,39, δ 6,87 et δ 6,38 correspondant aux protons aromatiques de la mangiférine (Wada *et al.*, 1995). Le singulet qui apparaît à δ 13,75 est caractéristique de la présence d'un groupe OH chélaté (Pretsch *et al.*, 2000), en l'occurrence celui qui se trouve en position 1 sur le noyau xanthone. Les autres groupes OH apparaissent comme un pic élargi à δ 10,6-10,4, grâce à la viscosité du DMSO.

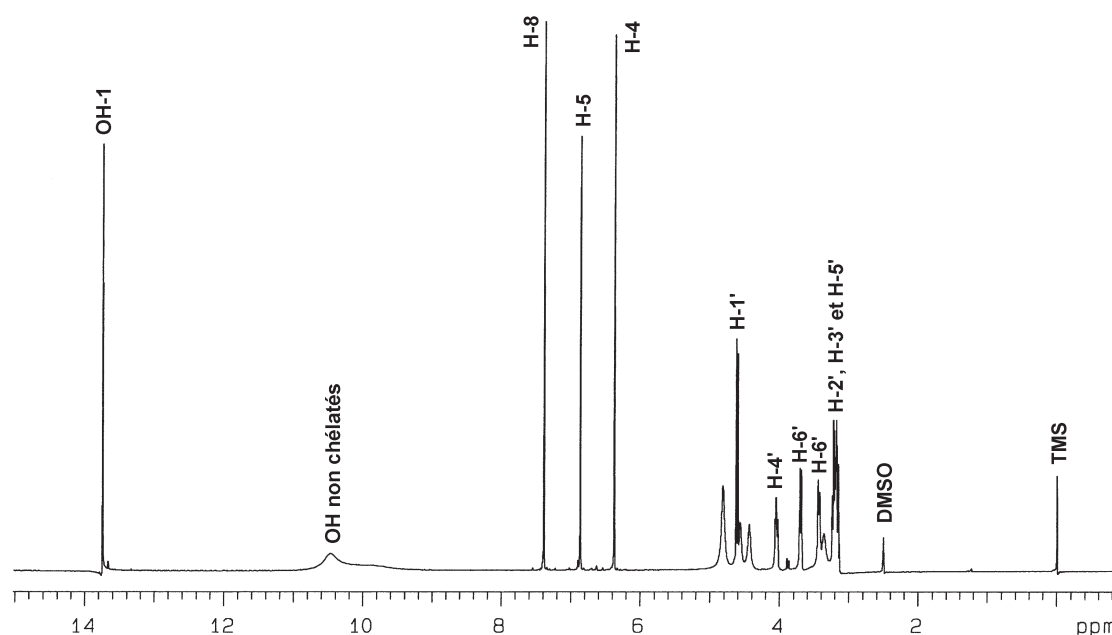


Figure 3.29 – Spectre ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) du composé C.

Sur le spectre ^{13}C -NMR dans le $\text{DMSO}-d_6$ (Figure 3.30), le signal à δ 179,3 correspond au déplacement caractéristique observé pour les groupes carbonyles des xanthones. Les 12 signaux des carbones aromatiques et les 6 signaux des carbones de l'unité glycosidique permettent de conclure de manière certaine que le composé **C** est bien la mangiférine (Miura *et al.*, 1978). Cette C-glucosylxanthone, isolée originellement de *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) par Wiechowski (Hostettmann et Wagner, 1977), est ubiquitaire dans le règne végétal. Il s'agit pourtant de la première xanthone à avoir été isolée chez les Thymelaeaceae. L'intérêt de sa présence concomitante avec les benzophénones **A** et **B** sera discuté au point 3.4.8.

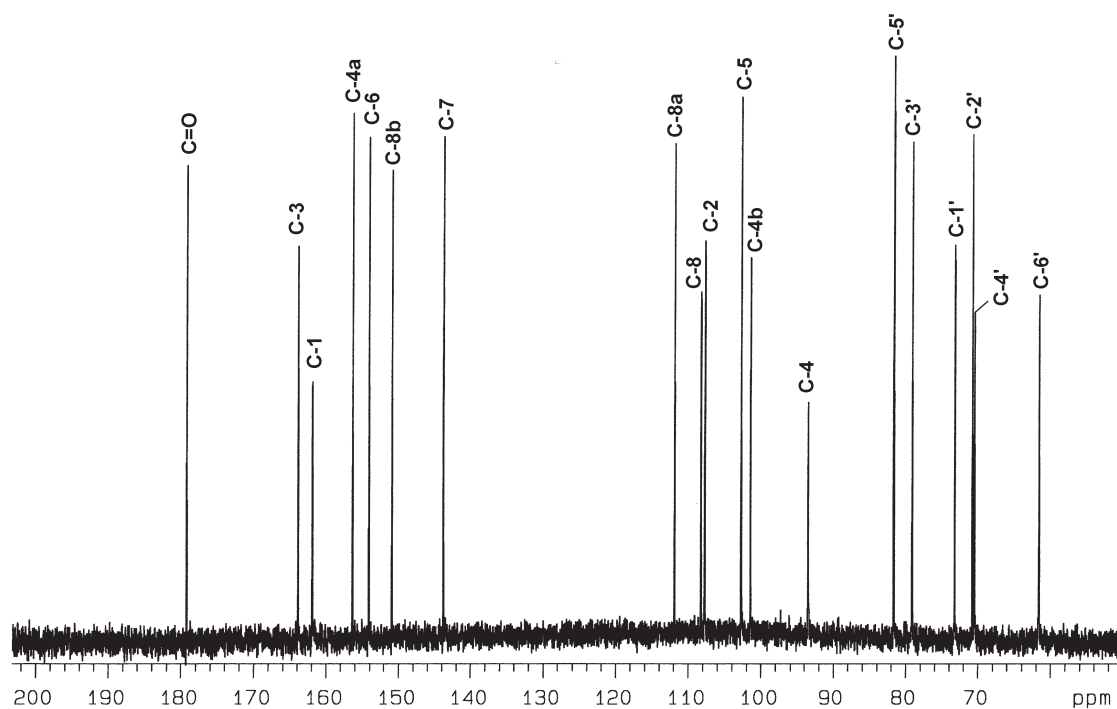
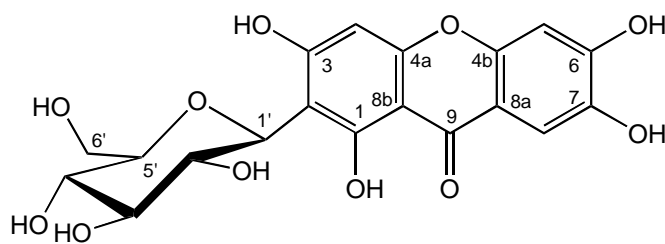


Figure 3.30 – Spectre ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé C.



Composé C :

2-C-β-glucosyl-1,3,6,7-tétrahydroxyxanthone (mangiférine)

3.4.7.4 « Composé D » (mélange des isomères D₁ et D₂)

Ce produit se présente sous la forme d'une fine poudre jaune et son spectre UV (*cf.* Figure 3.6) n'est pas sans rappeler celui d'une flavanone ou d'un dihydroflavonol (Markham, 1982). La formule brute C₃₀H₂₂O₁₃ du composé **D** a été déterminée sur la base d'analyses de spectrométrie de masse (D/CI-, EI- et hrESI-MS) et de résonance magnétique nucléaire (¹H- et ¹³C-NMR).

Le spectre D/CI en mode positif (Figure 3.31) montre les pics des adduits de l'ion moléculaire à m/z 608 ([M+NH₄]⁺) et m/z 591 ([M+H]⁺).

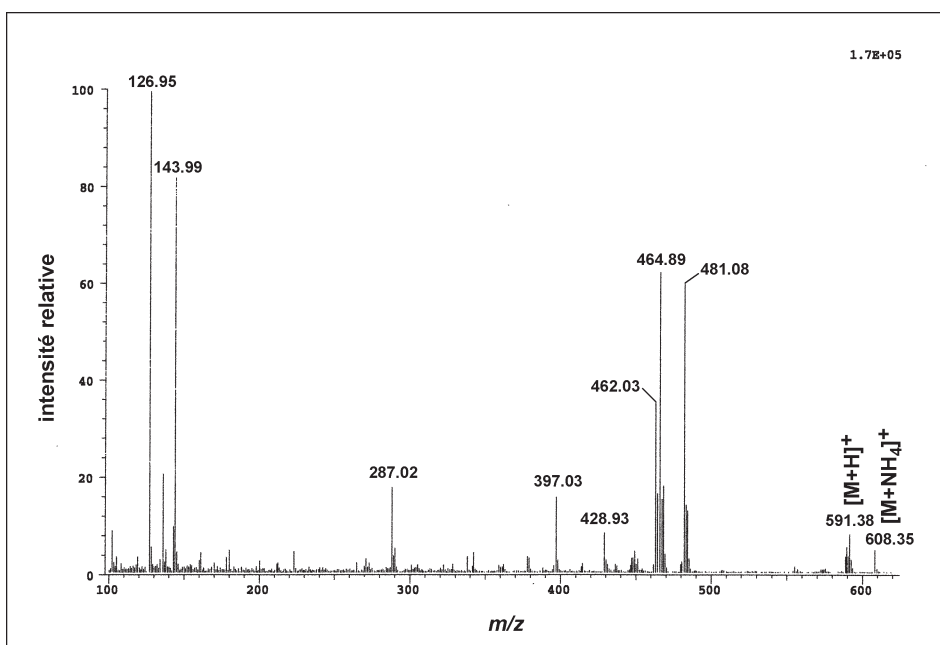


Figure 3.31 – Spectre D/CI-MS en mode d'ionisation positive du composé **D**.

Le spectre EI-MS (Figure 3.32) confirme la masse de 590 Da, avec un pic moléculaire à m/z 590 ([M]⁺). Quant aux fragments à m/z 464, m/z 446 et m/z 126 ([C₆H₆O₃]⁺), ils rappellent la fragmentation d'un 3,8''-biflavonoïde, la manniflavanone, décrite par Crichton et Waterman (1979). Ce composé naturel a également été isolé dans le présent travail (*cf.* 3.4.7.7, composé **G**) et le schéma de fragmentation dont il est question est présenté dans la Figure 3.49.

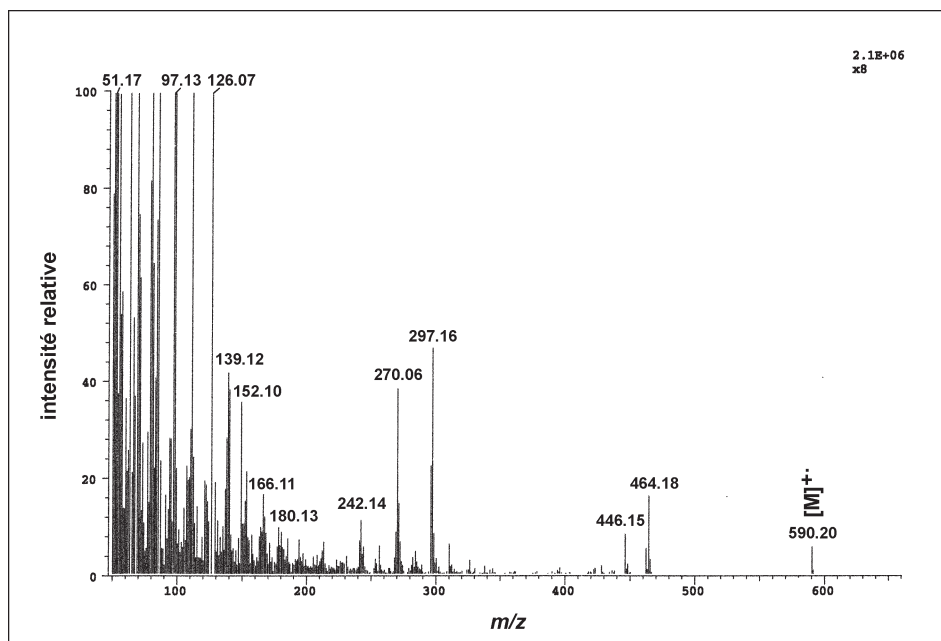


Figure 3.32 – Spectre EI-MS du composé D.

Pour nous assurer de la masse moléculaire de 590 Da et obtenir la formule brute de ce composé, une analyse de spectrométrie de masse à haute résolution par électrospray (hrESI-MS) a été réalisée. Le spectre ainsi obtenu (Figure 3.33) montre un adduit de l'ion moléculaire avec le sodium à m/z 613,09561 ($[M+Na]^+$), correspondant à la formule brute $C_{30}H_{22}O_{13}$ pour le composé **D** (calculé : m/z 613,09526).

En étudiant le spectre ^{13}C -NMR du composé **D** dans le $DMSO-d_6$ (Figure 3.34) on s'aperçoit que la plupart des signaux sont dédoublés, suggérant la présence de deux composés de structures très proches en mélange. En partant de cette supposition et en s'appuyant sur la formule brute déterminée précédemment et les données de fragmentation EI-MS, une première série d'attributions a pu être faite en regroupant les paires de signaux. Les pics à δ 196-198 sont caractéristiques des groupes carboxyles du cycle C des flavanones substituées en C-3. Les signaux à δ 107,1 et δ 107,0 représentent des résonances caractéristiques des carbones tertiaires d'un cycle B de flavonoïde à substitution 3,4,5-trihydroxy, alors que ceux à δ 129,4, δ 128,8, δ 115,2 et δ 115,0 sont caractéristiques des carbones d'un cycle B 4-hydroxylé. Finalement, les résonances à δ ~72 et δ 47-49 sont typiques des C-3 des dihydroflavonols et des flavanones respectivement (Markham et Chari, 1982).



FTMS 4.7T BioAPEX II MS-Service UNI Fribourg

Ion mass = 613.0956130

Charge = +1

#	C	H	O	Na	mass	DBE	error
*** Mass Analysis for mass 613.0956130							
1	30	22	13	1	613.0952619	19.5	3.511e-04
2	32	21	13	0	613.0976672	22.5	2.054e-03
3	39	17	8	0	613.0917939	31.5	3.819e-03
4	23	26	18	1	613.1011351	10.5	5.522e-03
5	37	18	8	1	613.0893886	28.5	6.224e-03
6	25	25	18	0	613.1035404	13.5	7.927e-03
7	41	18	5	1	613.1046448	32.5	9.032e-03
8	46	13	3	0	613.0859207	40.5	9.692e-03
9	43	17	5	0	613.1070501	35.5	1.144e-02
10	44	14	3	1	613.0835154	37.5	1.210e-02

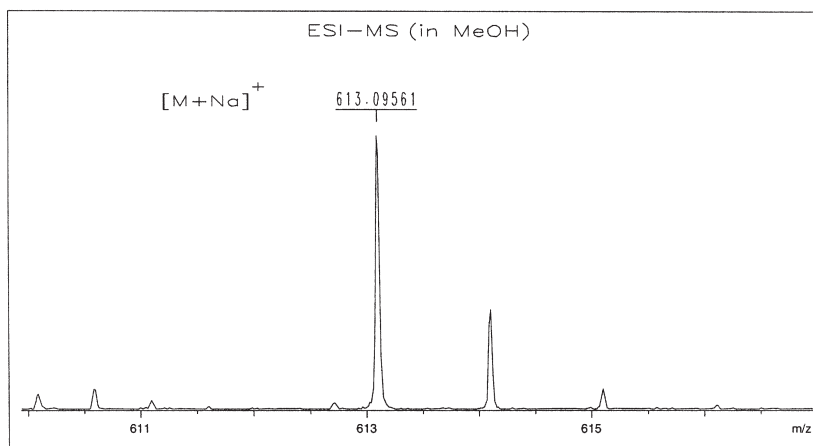


Figure 3.33 – Rapport d’analyse hrESI-MS du composé D. Les formules brutes proposées sont données dans l’ordre décroissant d’exactitude et non de pertinence.

Par comparaison avec les données de la littérature sur la ^{13}C -NMR des biflavonoïdes (Chari *et al.*, 1977 ; Duddeck *et al.*, 1978 ; Markham et Chari, 1982), nous avons pu établir que nous avions affaire à un 3,8''-biflavonoïde constitué d’une unité dihydroflavonol et d’une unité flavanone. Ce type de molécule possède quatre carbones asymétriques (C-2, C-3, C-2'' et C-3''), ce qui nous a amené à considérer que le « composé **D** » pouvait être un mélange de deux stéréoisomères **D**₁ et **D**₂. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les spectres de masse ne permettent pas de soupçonner la présence de plus d’un composé.

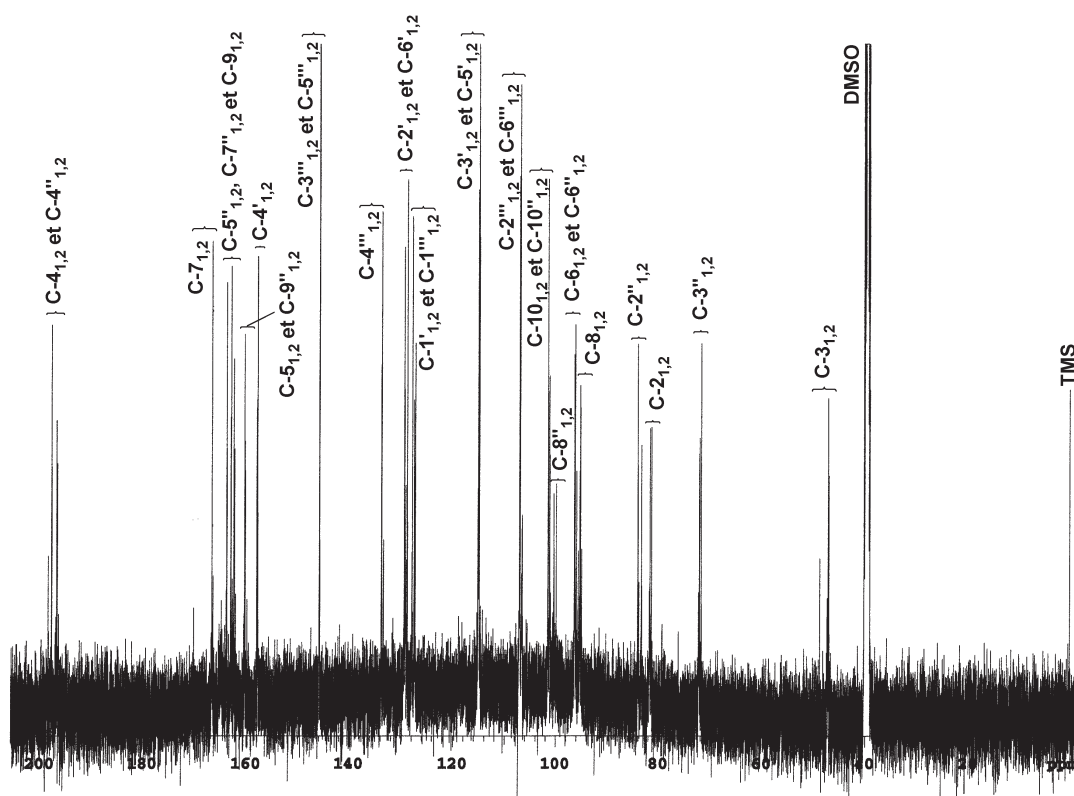


Figure 3.34 – Spectre ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du « composé D ». Les indices 1 et 2 se rapportent respectivement aux isomères D_1 et D_2 présents dans le mélange.

Les signaux du spectre ^1H -NMR dans le $\text{DMSO-}d_6$ à 30 °C (Figure 3.35) présentent une résolution relativement mauvaise. Celle-ci peut d'une part être expliquée par la présence de deux isomères en mélange, mais ce phénomène a déjà été décrit pour les biflavonoïdes purs de la série GB, pour lesquels des mesures à 100-120 °C dans le $\text{DMSO-}d_6$ sont préconisées afin d'améliorer l'apparence des spectres ^1H - et ^{13}C -NMR (Jackson *et al.*, 1971). Selon ces auteurs, la dépendance des spectres de NMR par rapport à la température est attribuée à l'existence de diverses conformations préférentielles qu'adoptent ces molécules à basse température. En effet, les nombreux groupes hydroxyles présents produisent de solides liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires.

Les quatre singulets entre δ 12,20 et δ 11,85 correspondent aux protons des groupes hydroxyles en C-5 et C-5'' formant des ponts hydrogène avec les fonctions carbonyles des cycles C. Le signal étendu à δ 11,5-10,6 est attribué aux groupes hydroxyles non chélatés des deux stéréoisomères. Les doublets à δ 7,18, δ 6,99, δ 6,81 et δ 6,69 ($J = 8,0$ Hz) confirment la

présence d'un cycle B possédant un système de protons AA'BB', alors que les deux singulets à δ 6,46 et δ 6,43 définissent un cycle B à système AA'. La zone mal résolue entre δ 5,91 et δ 5,85 est dominée par le large singulet correspondant aux protons H-6'' et un multiplet regroupant les doublets des protons H-6 et H-8 (Crichton et Waterman, 1979). Les protons des cycles C sont mis en évidence par les résonances situées entre δ 5,72 et δ 3,95 (Crichton et Waterman, 1979). Les valeurs de leurs constantes de couplage vicinales, situées entre 11,5 Hz et 12,0 Hz, montrent que les paires H-2/H-3 des 2 stéréoisomères ont toutes des positions relatives *trans* diaxiales (Karplus, 1963).

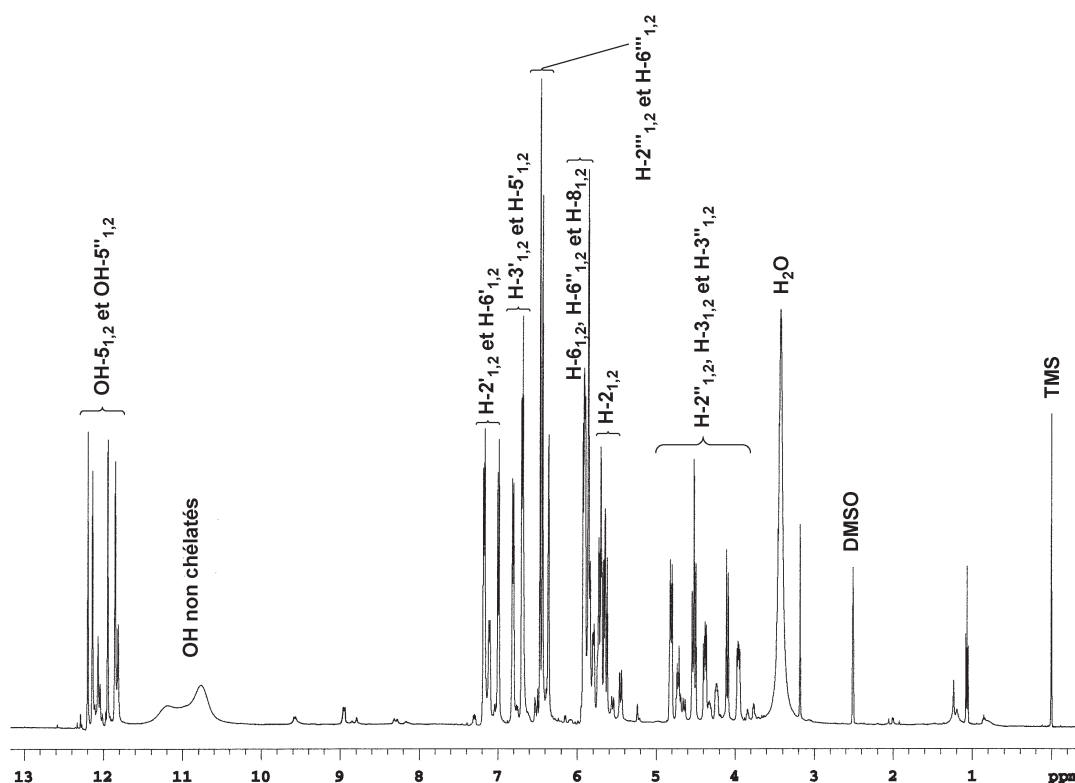


Figure 3.35 – Spectre ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du « composé D ». Les indices 1 et 2 se rapportent respectivement aux isomères D_1 et D_2 présents dans le mélange.

Des expériences de corrélations hétéronucléaires à courte (HSQC ; Figure 3.36) et à longue distance (HMBC ; Figure 3.37) ont permis l'attribution complète des signaux. Dans la plupart des cas, il a également été possible de regrouper les signaux appartenant au même isomère.

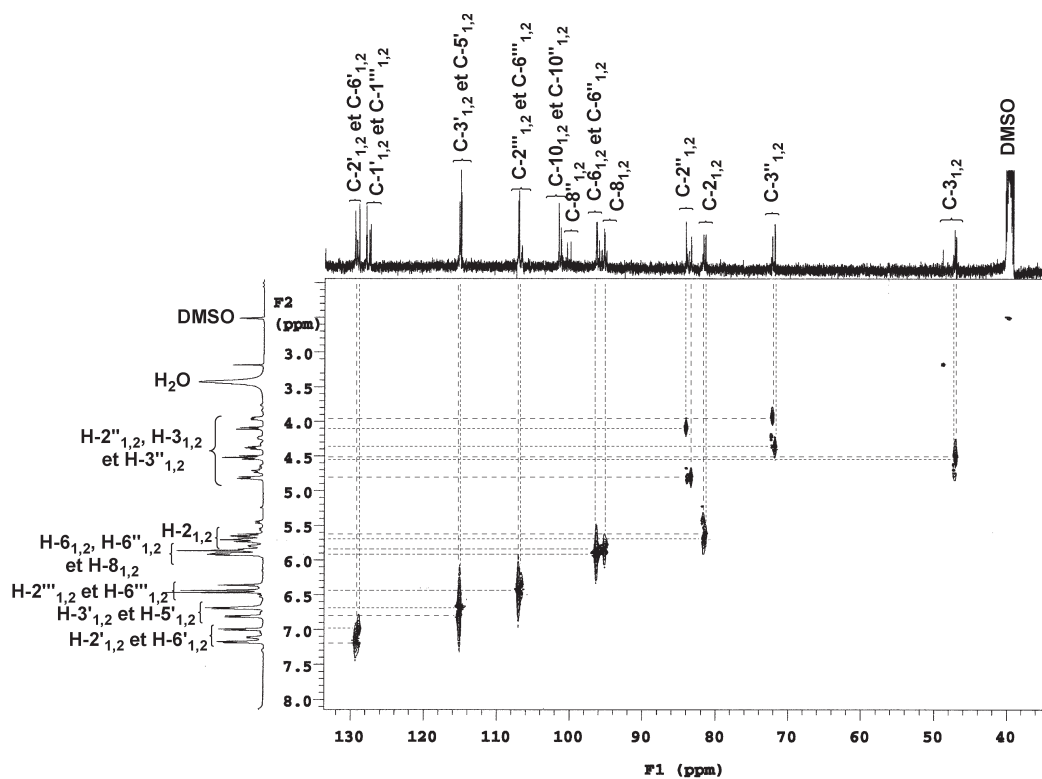


Figure 3.36 – Spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC du mélange des isomères D₁ et D₂ (---/---).

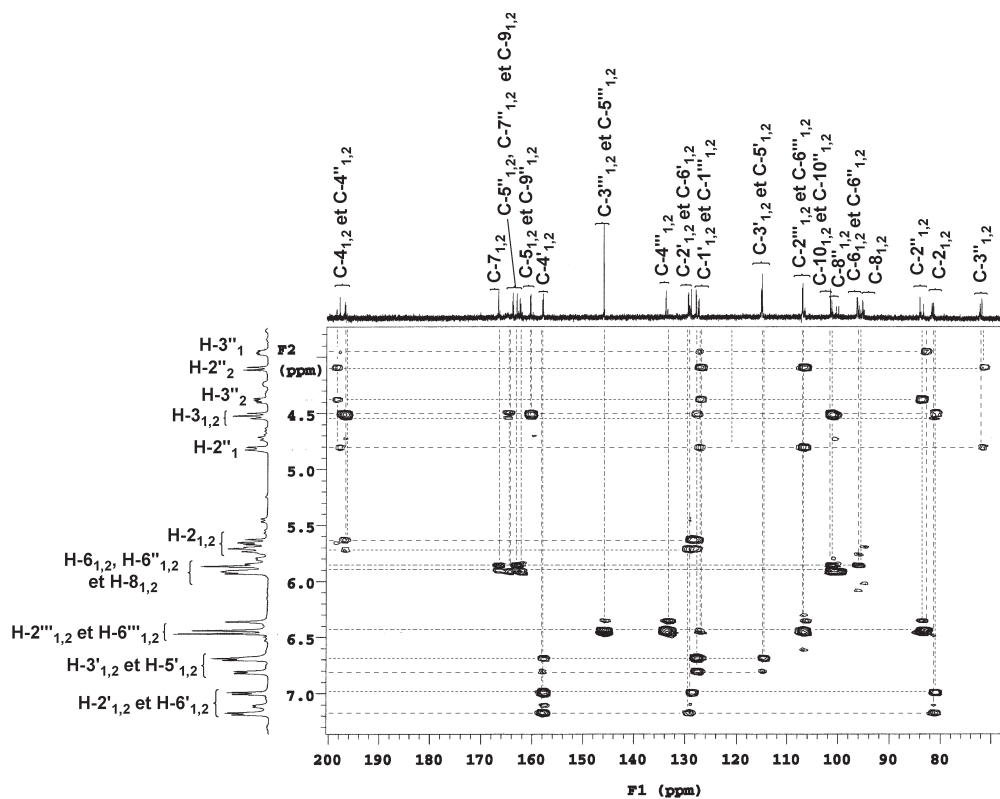


Figure 3.37 – Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du mélange des isomères D₁ et D₂ (---/---).

Pour confirmer le degré d'hydroxylation suggéré par la formule brute et les données ^1H - et ^{13}C -NMR, le mélange d'isomères a été acétylé (*cf.* 5.7.1). Une analyse hrESI-MS a ensuite été réalisée sur le mélange des composés **D**₁ et **D**₂ peracétylés. La Figure 3.38 montre le spectre issu de cette mesure, qui présente un pic à m/z 991 correspondant à l'adduit de la molécule nona-acétylée et du sodium.

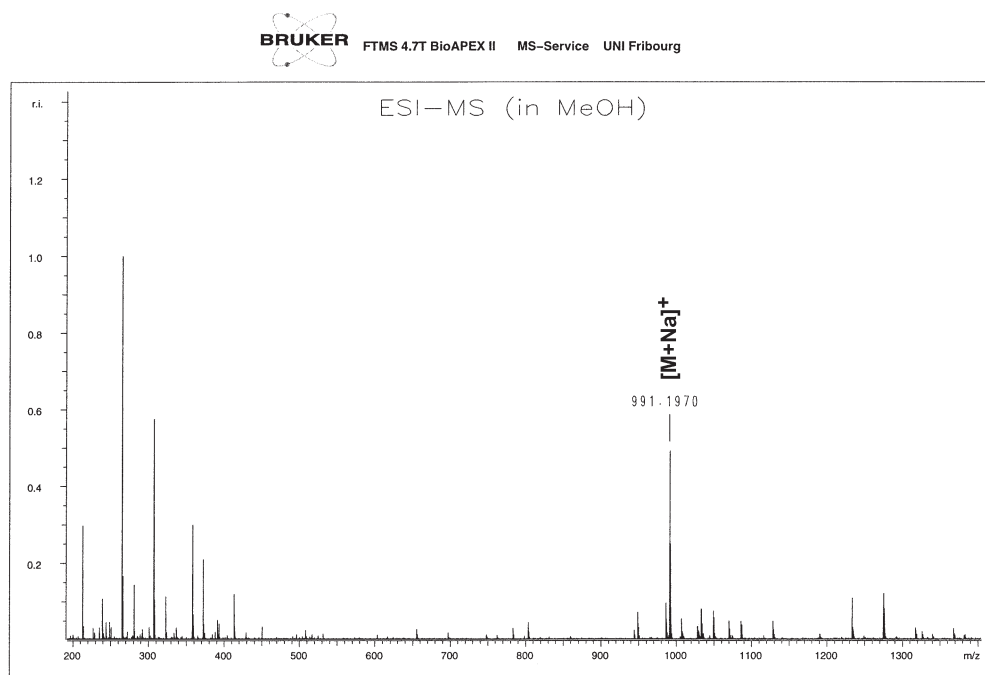


Figure 3.38 – Spectre hrESI-MS du composé D nona-acétylé.

Comme ces deux isomères n'ont pas pu être séparés de manière satisfaisante, il a fallu trouver un moyen de les distinguer par la détermination des configurations absolues de leurs centres chiraux *on-line*. La méthode de choix dans cette approche est l'HPLC couplée à la spectrométrie de dichroïsme circulaire (*cf.* 5.2.5).

La Figure 3.39a présente le chromatogramme LC/CD à 281 nm et les spectres CD enregistrés *on-line* du mélange des isomères **D**₁ et **D**₂, alors que la Figure 3.39b montre le chromatogramme LC/UV et les spectres UV correspondants. On voit donc que, malgré des spectres UV identiques, les deux stéréoisomères en mélange sont aisément différenciables par leurs spectres CD.

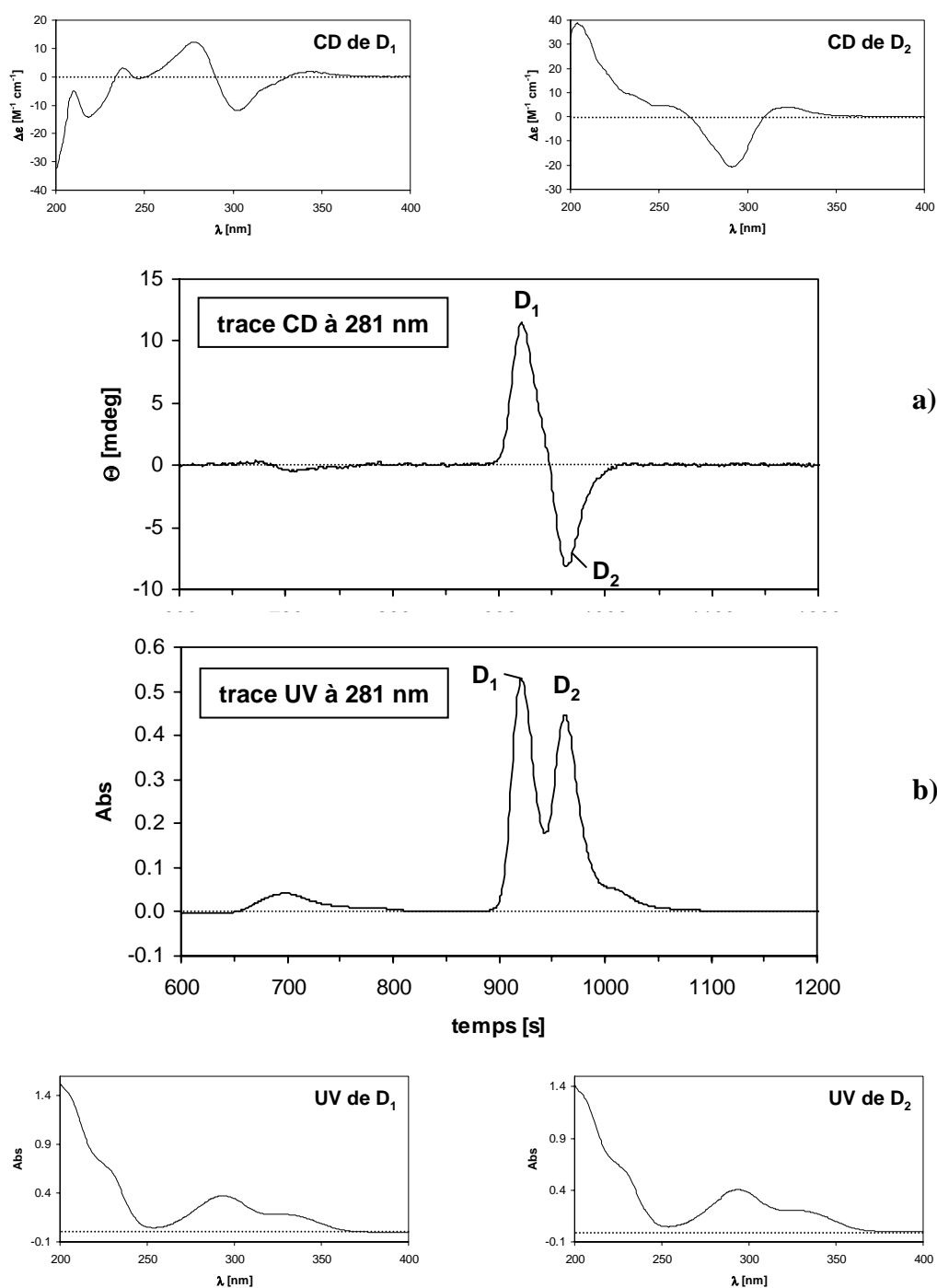


Figure 3.39 – Chromatogramme LC/CD à 281 nm et spectres enregistrés *on-line* du mélange des isomères D_1 et D_2 (a). Chromatogramme LC/UV à 281 nm et spectres enregistrés *on-line* du mélange des isomères D_1 et D_2 (b). Conditions expérimentales décrites sous 5.2.5.

Le signe de l'effet Cotton à la transition $n \rightarrow \pi^*$ (~330 nm) des arylcétones, telles que les flavanones et les 3-hydroxyflavanones, est déterminé par la conformation absolue de l'hétérocycle (Gaffield, 1970). Un effet Cotton positif à la bande d'absorption $n \rightarrow \pi^*$

correspond à la conformation illustrée dans la Figure 3.40, alors qu'un effet Cotton négatif se rapporte à la conformation absolue de l'image miroir de celle-ci.

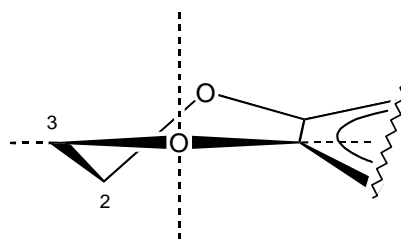


Figure 3.40 – Conformation absolue des flavanones exprimant un effet Cotton positif à la bande d'absorption $n \rightarrow \pi^*$ (Gaffield, 1970).

Ainsi, Gaffield a énoncé la règle suivante pour les flavanones et les 3-hydroxyflavanones : les flavanones de configuration $2S$ et les 3-hydroxyflavanones de configuration $2R,3R$ dont tous les substituants sont en positions équatoriale, montrent un effet Cotton positif dû à la transition $n \rightarrow \pi^*$ et un effet Cotton négatif dans la région 1Lb ($\pi \rightarrow \pi^*$; $\sim 280\text{-}290\text{ nm}$). En connaissant les constantes de couplage vicinales des protons des cycles C, les stéréochimies relatives de C-2, C-3, C-2'' et C-3'' peuvent être déterminées. Ainsi, les valeurs d'env. 12 Hz dont nous avons parlé précédemment plaident pour des positions relatives *trans* diaxiales entre les protons de toutes les paires H-2/H-3 en présence (Karplus, 1963).

Pour les 3,8''-biflavanones, Duddeck *et al.* (1978) ont montré que le couplage entre les moments de transition localisés dans les 2 cycles aromatiques des flavanones est négligeable, *i.e.* qu'il n'y a pas de couplage d'exciton. Par conséquent, nous avons affaire à des transitions électroniques presque complètement séparées de 2 chromophores distincts. La comparaison des spectres CD des deux pics enregistrés *on-line* montre qu'une transition $n \rightarrow \pi^*$ et une transition 1Lb sont inversées, ce qui a permis d'attribuer les différents effets Cotton à leur chromophore respectif. En effet, le premier pic (**D₁**) montre un épaulement négatif à 323,5 nm (transition $n \rightarrow \pi^*$), qui est inversé dans le second (**D₂**). Cette inversion entraîne un déplacement hypsochrome de la bande $n \rightarrow \pi^*$ positive inchangée. De la même manière, il y a un effet Cotton positif 1Lb dans le premier pic (**D₁**) qui est inversé dans le second (**D₂**), causant également un déplacement hypsochrome (de 301,5 nm à 291,5 nm) et la formation d'un large pic négatif (somme de 2 effets Cotton). Par chance, les effets Cotton des

chromophores flavanone et 3-hydroxyflavanone sont de signe opposé pour **D**₁, ce qui permet de les différencier facilement.

Pour assigner correctement les effets Cotton à leur chromophore correspondant, nous nous sommes basés sur le travail de Gaffield (1970) consacré à l'étude des spectres CD de flavanones et de 3-hydroxyflavanones. L'une des conclusions qu'il en a tirées, est que les transitions de ces dernières apparaissent à des longueurs d'onde plus grandes que celles des flavanones (déplacement bathochrome). Cette observation a d'ailleurs été soutenue par d'autres travaux plus récents (Ahmed *et al.*, 2001 ; Nonaka *et al.*, 1987). Sur la base de ces remarques préliminaires, l'étude des spectres CD des isomères **D**₁ et **D**₂ (Figure 3.39a) a apporté les informations suivantes :

- isomère **D**₁ :

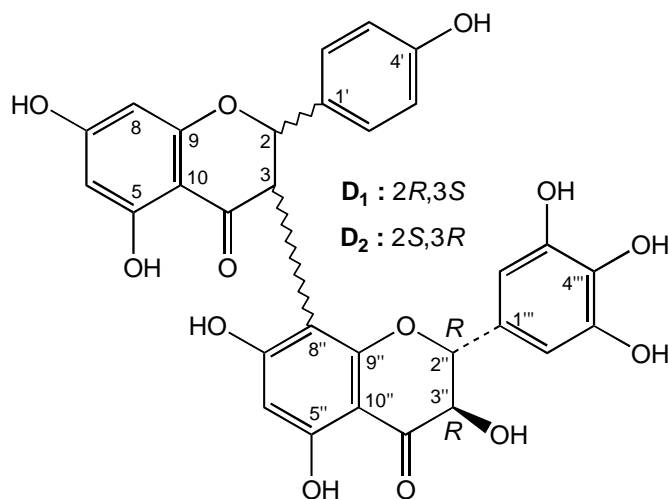
La transition $n \rightarrow \pi^*$ positive à 343,5 nm permet de connaître la conformation absolue de l'hétérocycle de l'unité 3-hydroxyflavanone d'après les travaux de Gaffield (1970) (*cf.* Figure 3.40). Comme les constantes de couplage en ¹H-NMR nous montrent que les substituants en C-2'' et C-3'' sont équatoriaux, les configurations absolues sont 2''*R*,3''*R*. Les effets Cotton négatif 1Lb à 301,5 nm et positif 1La à 237,5 nm confirment la configuration absolue 2''*R*. L'épaule négatif à 323,5 nm est assigné à la transition $n \rightarrow \pi^*$ de l'unité flavanone et permet de conclure à une conformation absolue de l'hétérocycle opposée à celle de l'unité 3-hydroxyflavanone. Comme les substituants en C-2 et C-3 ont également un arrangement *trans* diéquatorial, la configuration absolue de ces stéréocentres est 2*R*,3*S*. Les effets Cotton positif à 278,5 nm (1Lb) et négatif à 218,5 nm (1La) viennent étayer cette affirmation.

- isomère **D**₂ :

Le maximum observé à 322,0 nm est la résultante de 2 transitions $n \rightarrow \pi^*$ positives, l'une de la partie 3-hydroxyflavanone et l'autre de la partie flavanone. Les transitions $n \rightarrow \pi^*$ des 3-hydroxyflavanones des isomères **D**₁ et **D**₂ sont de même signe, ce qui signifie que les configurations absolues de ces unités sont identiques (2''*R*,3''*R*), car les substituants en C-2'' et C-3'' du composé **D**₂ sont également équatoriaux. Entre 260 nm et 300 nm, il n'y a qu'une intense bande négative résultant de 2 transitions

1Lb négatives. Alors que la bande 1Lb de l'unité 3-hydroxyflavanone ne change pas par rapport à **D**₁, celle de l'unité flavanone est inversée. Cela se traduit donc par la présence d'une intense et large transition 1Lb négative ayant subi un déplacement hypsochrome de 301,5 nm à 291,5 nm. L'inversion de la transition $n \rightarrow \pi^*$ à 216,5 nm (1La) signifie que l'hétérocycle de l'unité flavanone de **D**₂ adopte une conformation absolue opposée à celle de **D**₁. Comme les substituants ont là encore un arrangement *trans* diéquatorial, la configuration absolue est 2*S*,3*R*. Cette conclusion est appuyée par le fait que les bandes 1Lb et 1La du chromophore flavanone sont toutes deux inversées.

A la lumière des données spectrales recueillies, le « composé **D** » a pu être identifié comme étant le mélange des stéréoisomères **D**₁ et **D**₂ en positions 2 et 3 de la 3'',3''',4',4''',5,5'',5''',7,7''-nonahydroxy-3,8''-biflavanone. Il s'agit de deux nouveaux produits naturels de type biflavonoïde, qui peuvent être apparentés à la série des GB, tel qu'il en a déjà été mis en évidence chez les Thymelaeaceae (*cf.* 2.2.3.4 : daphnodorines et wikstrols).



Composés **D₁ et **D**₂ : diastéréoisomères de la
3'',3''',4',4''',5,5'',5''',7,7''-nonahydroxy-3,8''-biflavanone**

3.4.7.5 Composé E

Ce produit se présente sous la forme d'une fine poudre d'un jaune intense et son spectre UV (*cf.* Figure 3.6) est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en OH-3 avec des maxima à 267 nm et 349 nm (Markham, 1982). La formule brute $C_{21}H_{20}O_{11}$ du composé **E** a été déterminée sur la base d'analyses de spectrométrie de masse (D/CI-MS) et de résonance magnétique nucléaire (1H - et ^{13}C -NMR).

Le spectre D/CI-MS en mode positif (Figure 3.41) montre le pic de l'ion moléculaire protoné à m/z 449 ($[M+H]^+$) et un fragment à m/z 287 ($[M+H-162]^+$), caractéristique de la perte d'une unité *O*-hexosyle.

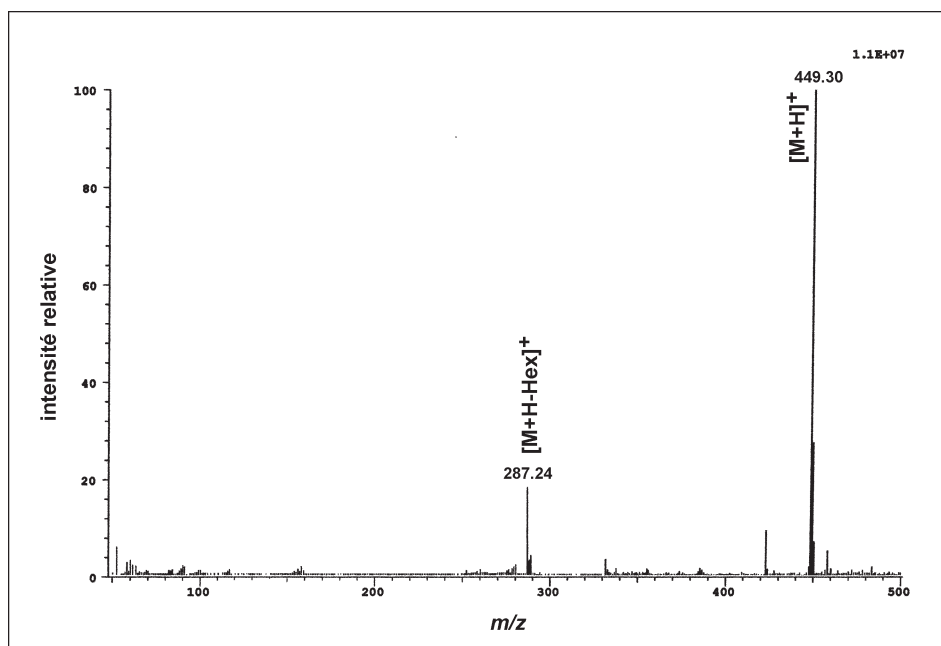


Figure 3.41 – Spectre D/CI-MS en mode d'ionisation positive du composé **E**.

Comme une structure de type flavonoïde est suggérée, une analyse par spectrophotométrie UV à l'aide de réactifs de déplacements a été menée d'après Markham (1982) (*cf.* 5.4.3). Le Tableau 3.4 présente les résultats obtenus sur le composé **E**.

**Tableau 3.4 – Interprétation des déplacements observés par analyse spectrophotométrique UV
du composé E d’après Markham (1982).**

Réactif de déplacement	Bande I	Bande II	Interprétation
MeOH	348,5 nm	267,0 nm	flavone ou flavonol substitué en OH-3
MeONa (base forte)	400,5 nm (+ 52,0 nm, même int.)	274,0 nm	OH-4'
AlCl ₃	396,5 nm (+ 50,5 nm)	274,5 nm	OH-5
AlCl ₃ /HCl	394,0 nm (+ 45,5 nm)	274,5 nm	
NaOAc (base faible)	381,5 nm (+ 33,0 nm, même int.)	274,0 nm (+ 7,0 nm)	OH-7
NaOAc/H ₃ BO ₃	348,5 nm (aucun dépl.)	267,0 nm	-

Les observations ci-dessus permettent de proposer une première hypothèse structurale pour le flavonoïde **E** : flavone ou flavonol substitué en OH-3 possédant des groupes hydroxyles en positions 4', 5 et 7.

Comme la présence d'un sucre a pu être démontrée par D/CI-MS (Figure 3.41), nous avons entrepris l'hydrolyse du composé **E**, comme décrit sous 5.7.3. Cette opération nous a permis d'identifier par TLC, après vaporisation du réactif à la diphénylamine, la partie glycosidique comme étant le glucose (R_f 0,36, brun-vert). L'analyse à l'aide des réactifs de déplacement a été ensuite menée sur l'aglycone et les résultats de cette dernière sont résumés dans le Tableau 3.5.

**Tableau 3.5 – Interprétation des déplacements observés par analyse spectrophotométrique UV
du composé E hydrolysé d’après Markham (1982).**

Réactif de déplacement	Bande I	Bande II	Interprétation
MeOH	365,0 nm	262,5 nm	flavonol avec OH-3 libre
MeONa (base forte)	419,0 nm (+ 54,0 nm, même int.)	270,0 nm	OH-4'
AlCl ₃	424,0 nm (+ 59,0 nm)	269,0 nm	OH-3 possible (avec ou sans OH-5)
AlCl ₃ /HCl	324,5 nm (+ 59,5 nm)	268,5 nm	
NaOAc (base faible)	393,5 nm (+ 28,5 nm, même int.)	268,5 nm (+ 6,0 nm)	OH-7
NaOAc/H ₃ BO ₃	368,5 nm (+ 3,5 nm)	267,0 nm	-

D’après ces observations, on remarque que le spectre UV de l’aglycone du composé **E** dans le méthanol est caractéristique d’un flavonol. Grâce au schéma de substitution déduit de l’analyse des modifications des spectres UV sous l’action des réactifs, on peut conclure que l’aglycone du composé **E** est le kaempférol. La comparaison des résultats avant et après hydrolyse permet de dire que le glucose est attaché en position OH-3 et que le composé **E** est par conséquent certainement le 3-*O*-glucosylkaempférol.

Sur le spectre ¹H-NMR dans le MeOH-*d*₄ (Figure 3.42) apparaissent des signaux déblindés à δ 8,05 (*J* = 9,0 Hz) et δ 6,88 (*J* = 9,0 Hz), intégrant chacun pour 2 protons et confirmant la présence d’un système A₂X₂ sur le cycle B. Les doublets à δ 6,38 (*J* = 2,0 Hz) et δ 6,19 (*J* = 2,0 Hz) sont attribués aux protons aromatiques du cycle A. Le signal à δ 5,23 (*J* = 7,5 Hz) est caractéristique du proton anomérique du β -glucose (Agrawal, 1992).

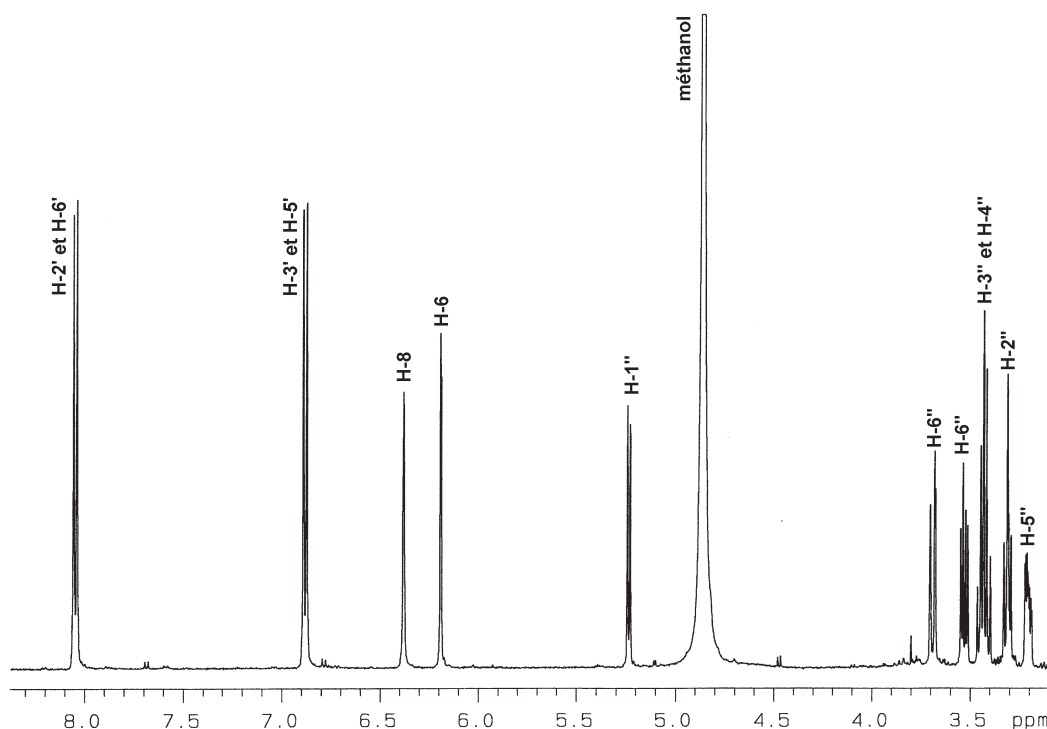


Figure 3.42 – Spectre ^1H -NMR (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé E.

Les signaux observés sur le spectre ^{13}C -NMR (Figure 3.43), après comparaison avec les données de la littérature (Markham, 1982 ; Markham et Chari, 1982), sont compatibles avec l'hypothèse de structure énoncée auparavant.

Au vu des différentes données spectrales discutées, le composé **E** a pu être identifié comme étant le 3-*O*- β -glucosylkaempférol, appelé aussi astragaline. Ce composé naturel a été caractérisé originellement dans des espèces d'*Astragalus* (Fabaceae), mais il a depuis été mis en évidence dans de nombreuses plantes, y compris chez les Thymelaeaceae. Ainsi, Lee *et al.* (1981) ont isolé l'astragaline de *Wikstroemia indica*, dont ils ont ensuite montré l'activité antileucémique intéressante *in vivo* chez la souris à des doses de 12,5 mg/kg. Ce flavonoïde cytotoxique a également été isolé des feuilles de *Diospyros kaki* Thunb., une Ebenaceae utilisée traditionnellement pour le traitement des maladies hypertensives au Japon. Kotani *et al.* (2000) ont testé l'activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) de quatre flavonoïdes qu'ils ont isolés de cette drogue : l'astragaline (majoritaire), le 3-*O*-galloglucosylkaempférol, l'isoquercitrine et la 3-*O*-galloglucosylquercétine. L'astragaline s'est révélé être le composé le plus actif avec une IC_{50} de 180 $\mu\text{g/ml}$. Kameda *et al.* (1987)

ont mis en évidence les propriétés antiallergiques de ce produit naturel et de *D. kaki*. Les tests consistaient à mesurer l'inhibition de la libération de l'histamine de cultures de cellules basophiles humaines et d'observer l'amélioration de dermatites atopiques chez la souris.

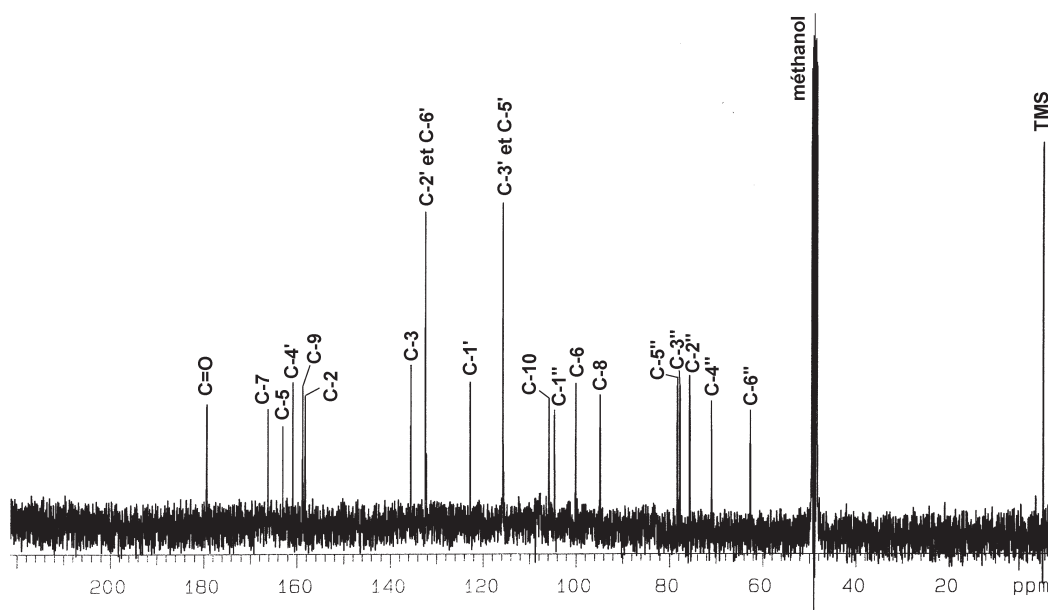
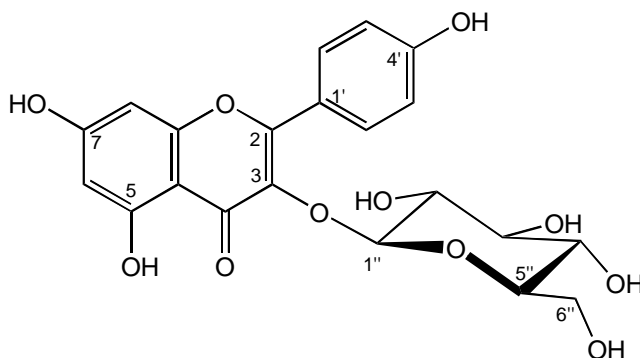


Figure 3.43 – Spectre ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé E.



Composé E : 3-O-β-glucosyl-4',5,7-trihydroxyflavone
(3-O-β-glucosylkaempférol, astragaline)

3.4.7.6 Composé F

Ce produit se présente sous la forme d'une fine poudre faiblement jaunâtre et son spectre UV (*cf.* Figure 3.6) est caractéristique d'une flavone ou d'un flavonol substitué en OH-3 avec ses maxima à 269 nm et 336 nm (Markham, 1982). La formule brute $C_{27}H_{30}O_{14}$ du composé **F** a été déterminée sur la base d'analyses de spectrométrie de masse (D/CI-MS) et de résonance magnétique nucléaire (1H - et ^{13}C -NMR) :

Le spectre D/CI-MS en mode positif (Figure 3.44) montre le pic de l'ion moléculaire protoné à m/z 579 ($[M+H]^+$) et des fragments à m/z 447 ($[M+H-132]^+$) et m/z 285 ($[M+H-132-162]^+$), correspondant à la perte successive d'une unité pentose et d'une unité hexose.

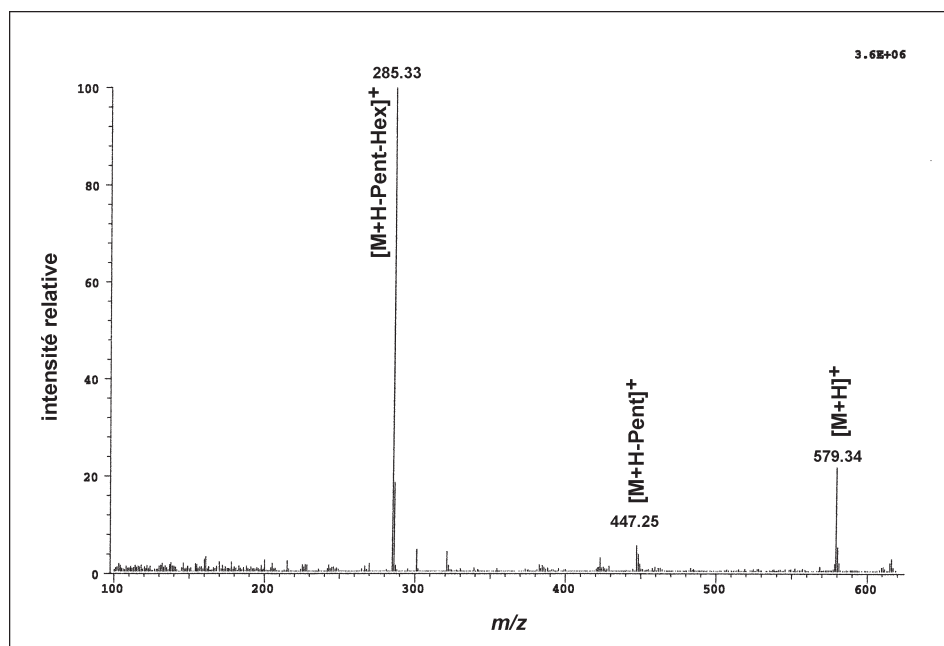


Figure 3.44 – Spectre D/CI-MS en mode d'ionisation positive du composé **F**.

Comme pour le flavonoïde **E**, nous avons entrepris une analyse par spectrophotométrie UV à l'aide de réactifs de déplacement (Markham, 1982), dont le Tableau 3.6 résume les observations.

**Tableau 3.6 – Interprétation des déplacements observés par analyse spectrophotométrique UV
du composé F d’après Markham (1982).**

Réactif de déplacement	Bande I	Bande II	Interprétation
MeOH	336,0 nm	269,0 nm	flavone ou flavonol substitué en OH-3
MeONa (base forte)	390,0 nm (+ 54,0 nm, même int.)	270,0 nm	OH-4'
AlCl ₃	343,0 nm (+ 7,0 nm)	269,0 nm	-
AlCl ₃ /HCl	343,5 nm (+ 7,5 nm)	269,5 nm	
NaOAc (base faible)	383,5 nm (+ 47,5 nm, même int.)	269,0 nm (aucun dépl.)	-
NaOAc/H ₃ BO ₃	340,0 nm (+ 4,0 nm)	268,0 nm	-

La seule information structurale qui est apportée par ces résultats, est que le composé **F** est une flavone ou un flavonol avec un groupe hydroxyle en position 4'.

L'analyse par D/CI-MS nous a montré le départ de deux sucres (Figure 3.47) et nous avons donc procédé à l'hydrolyse du composé **F** (cf. 5.7.3). Une TLC adaptée aux sucres, menée en comparaison avec des substances de référence et révélée au réactif à la diphénylamine, nous a permis d'identifier le glucose (R_f 0,33, brun-vert) et le xylose (R_f 0,50, rose). L'analyse avec les réactifs de déplacements s'est donc poursuivie sur la génine du composé **F** et le Tableau 3.7 en résume les observations principales.

**Tableau 3.7 – Interprétation des déplacements observés par analyse spectrophotométrique UV
du composé F hydrolysé d’après Markham (1982).**

Réactif de déplacement	Bande I	Bande II	Interprétation
MeOH	339,0 nm	272,0 nm	flavone ou flavonol substitué en OH-3
MeONa (base forte)	388,0 nm (+ 49,0 nm, même int.)	272,0 nm	OH-4'
AlCl ₃	382,0 nm (+ 43,0 nm)	279,0 nm	OH-5
AlCl ₃ /HCl	380,5 nm (+ 41,5 nm)	269,5 nm	
NaOAc (base faible)	383,5 nm (+ 57,0 nm, même int.)	272,0 nm (aucun dépl.)	-
NaOAc/H ₃ BO ₃	342,0 nm (+ 3,0 nm)	272,0 nm	-

Le seul changement notable intervenu par rapport à l’hétéroside, est l’apparition d’un groupe OH en position 5, ce qui suggère qu’il s’agissait de la position d’attache d’un sucre. Comme aucune autre modification n’est visible, il est très probable que la partie glycosidique soit un disaccharide constitué de glucose et de xylose. L’hypothèse structurale à l’issue de ces manipulations n’est pas très avancée et des analyses par NMR sont par conséquent nécessaires.

Sur le spectre ¹H-NMR dans le MeOH-*d*₄ (Figure 3.45) apparaissent des signaux déblindés à δ 7,83 (*J* = 8,5 Hz) et δ 6,95 (*J* = 8,5 Hz), intégrant chacun pour 2 protons et confirmant la présence d’un système A₂X₂ sur le cycle B. Les doublets à δ 6,93 (*J* = 2,0 Hz) et δ 6,85 (*J* = 2,0 Hz) sont caractéristiques d’un couplage en *méta* de deux protons aromatiques sur le cycle A. Comme la position 5 est hydroxylée (*cf.* Tableau 3.7), les seules positions possibles sont en 6 et en 8. Il reste encore à déterminer le type de substitution en position 7, car aucun

groupe OH n'y est mis en évidence par les réactifs de déplacement. Le fort singulet à δ 3,96 intégrant pour 3 protons est typique d'un groupe méthoxy et ce dernier doit donc se trouver en position 7. Le singulet à δ 6,60 peut, quant à lui, être attribué au proton en position 3 d'une flavone. Les doublets à δ 4,85 ($J = 7,5$ Hz) et δ 4,34 ($J = 7,5$ Hz) correspondent aux protons anomériques du β -glucose et du β -xylose (Agrawal, 1992). L'hypothèse de structure qui se profile est donc un noyau 4',5-dihydroxy-7-méthoxyflavone (genkwanine), *O*-glycosylé sur la position 5.

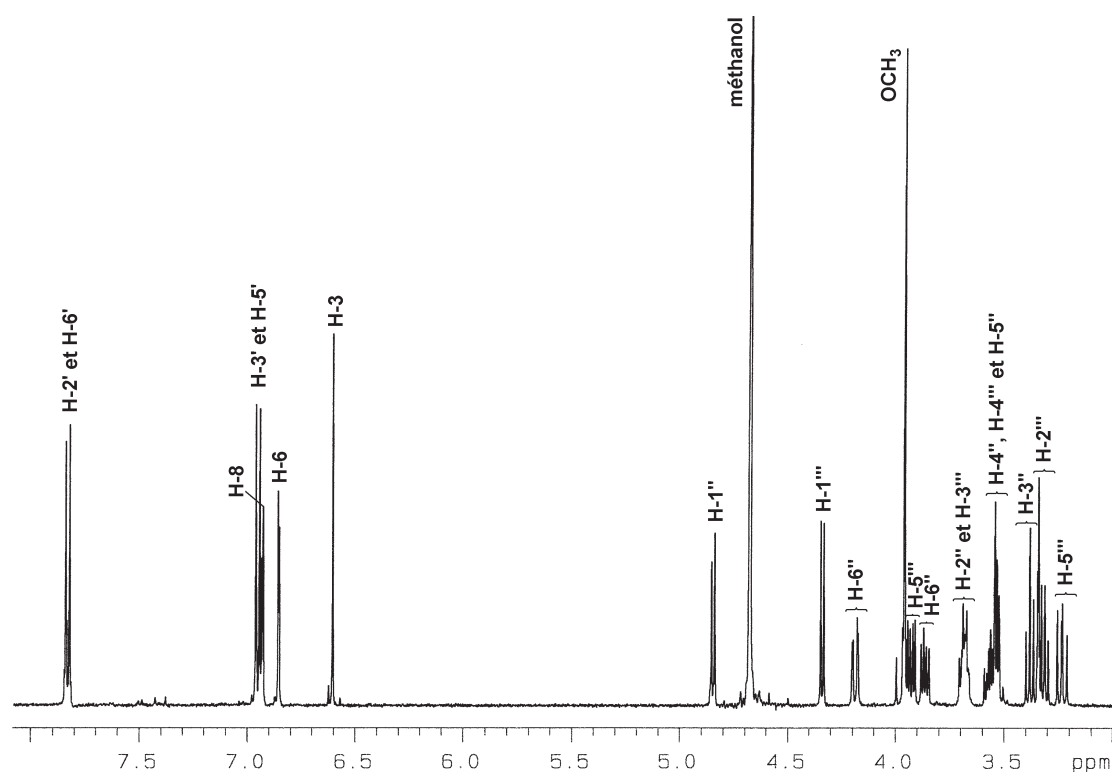


Figure 3.45 – Spectre $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé F.

L'analyse du spectre $^{13}\text{C-NMR}$ dans le $\text{MeOH-}d_4$ (Figure 3.46) nous permet d'attribuer les signaux de l'aglycone, qui s'avère définitivement être la genkwanine (Markham et Chari, 1982). Les déplacements chimiques des signaux attribués aux sucres permettent, d'après les travaux d'Agrawal (1992), d'affirmer la présence de primevérose, ou β -xylosyl-(1 \rightarrow 6)- β -glucose.

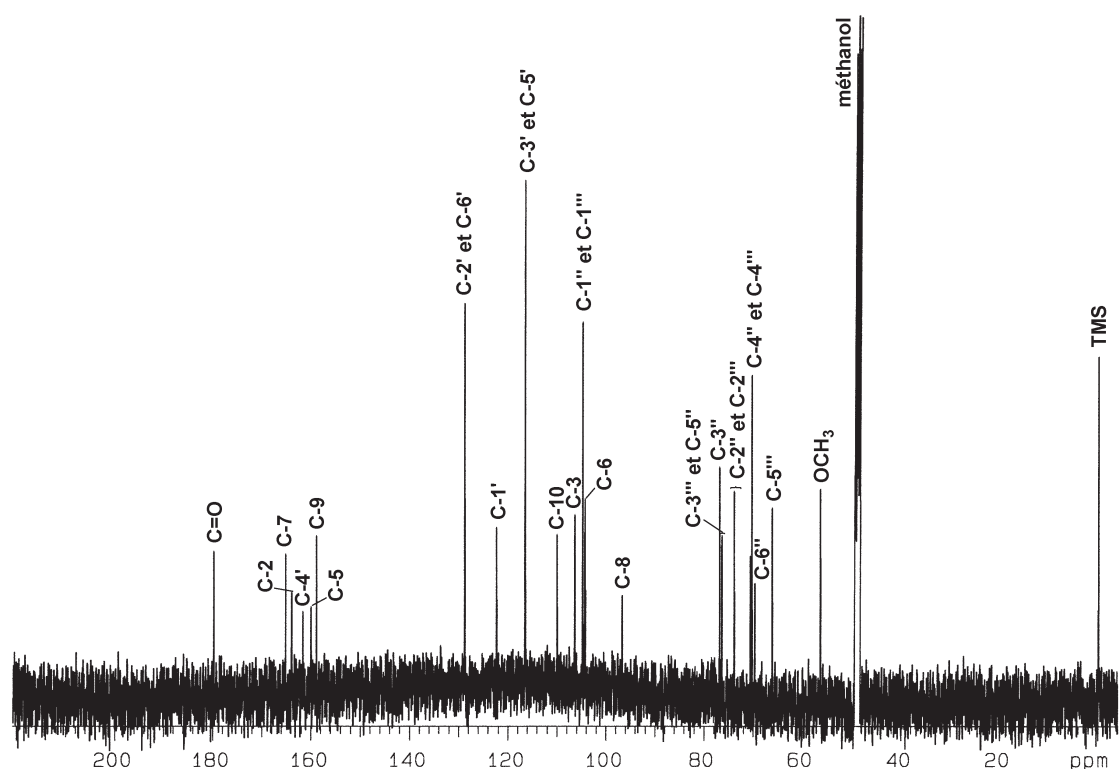
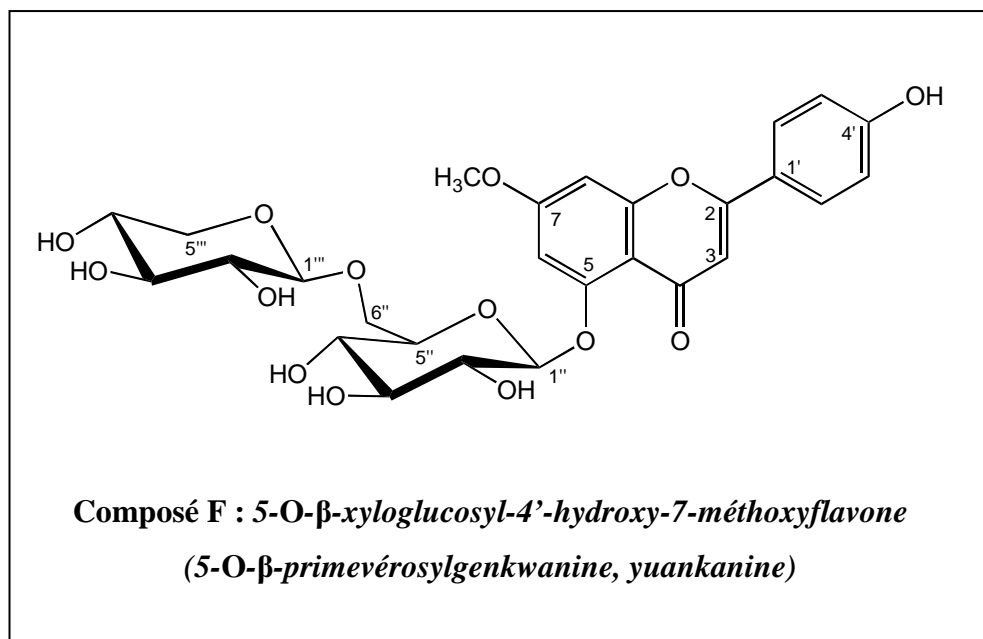


Figure 3.46 – Spectre ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) du composé **F**.

Par comparaison avec les données de la littérature, le composé **F** est identifié comme étant la 5-*O*- β -primevérosylgenkwanine ou yuankanine (García-Granados et Sáenz de Buruaga, 1980a ; Núñez-Alarcón *et al.*, 1973). Ce composé naturel est un 5-*O*-glycoside relativement rare, qui n'a été isolé que de quelques Thymelaeaceae : *Ovidia pillo-pillo* Meissn. (Núñez-Alarcón *et al.*, 1973), *Thymelaea tartonraira* L. (García-Granados et Sáenz de Buruaga, 1980c), *Daphne gnidium* L. et *Gnidia kraussiana* L. (Ragot *et al.*, 1988) et *D. genkwa* Sieb. et Zucc. (Lin *et al.*, 2001). Alors que Ragot *et al.* (1988) ont mis en évidence un effet cytotoxique de la yuankanine sur des cellules à membranes fragiles (p. ex. : lymphoblastes physiologiques et cellules leucémiques humaines), Lin *et al.* (2001) ont montré son absence d'activité sur des cellules HepG2 d'hépatome humain.



3.4.7.7 Composé G

Ce produit se présente sous la forme d'une fine poudre jaune et son spectre UV (*cf.* Figure 3.8) n'est pas sans rappeler celui d'une flavanone ou d'un dihydroflavonol (Markham, 1982), tout en étant similaire à celui du composé **D**. La formule brute $C_{30}H_{22}O_{13}$ du composé **G** a été établie sur la base d'analyses par spectrométrie de masse (D/CI- et EI-MS) et de résonance magnétique nucléaire (1H - et ^{13}C -NMR).

Le spectre D/CI en mode positif (Figure 3.47) montre les pics des adduits de l'ion moléculaire à m/z 608 ($[M+NH_4]^+$) et m/z 591 ($[M+H]^+$). Un pic correspondant au fragment issu de la perte d'une molécule d'eau est visible à m/z 573 ($[M+H-H_2O]^+$).

Sur le spectre EI-MS (Figure 3.48) on aperçoit un faible signal correspondant au pic moléculaire à m/z 590 ($[M]^+$), mais également des fragments à m/z 464, m/z 446, m/z 286 et le pic de base à m/z 126 (pyrogallol, $[C_6H_6O_3]^+$), caractéristiques de la fragmentation de la manniflavanone, un 3,8''-biflavonoïde (Crichton et Waterman, 1979). La première hypothèse de structure pour le composé **G** est qu'il doit donc s'agir d'un biflavonoïde ayant un schéma

de substitution proche de la manniflavanone, comme le composé **D**. Un schéma de fragmentation de ce composé partiel est présenté à la Figure 3.49.

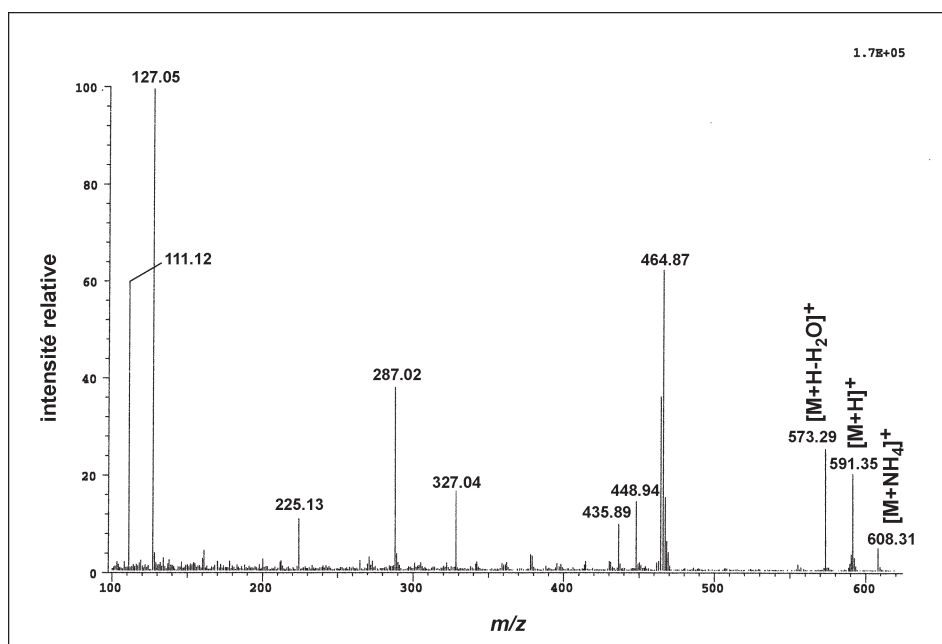


Figure 3.47 – Spectre D/CI-MS en mode d'ionisation positive du composé G.

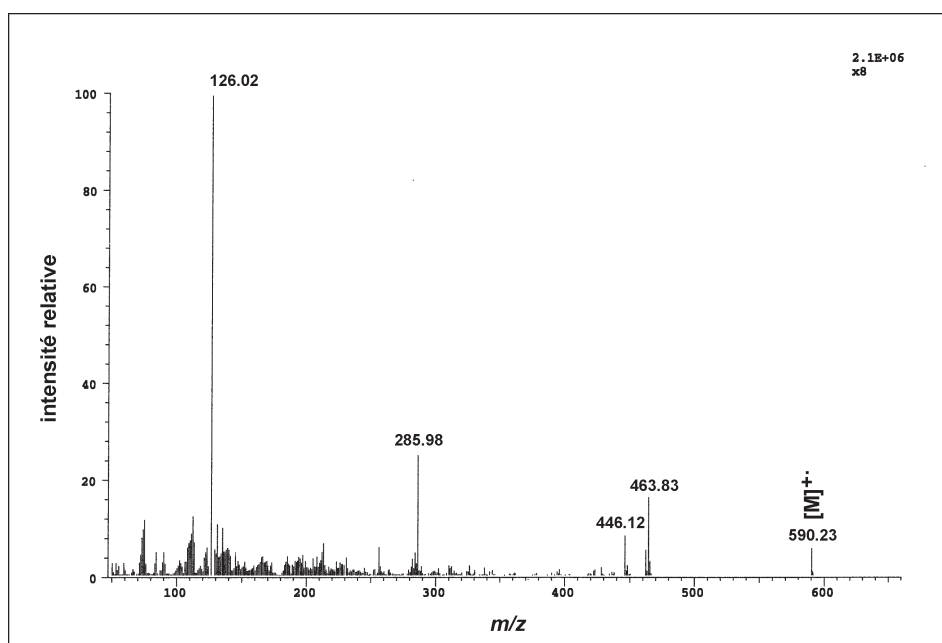


Figure 3.48 – Spectre EI-MS du composé G.

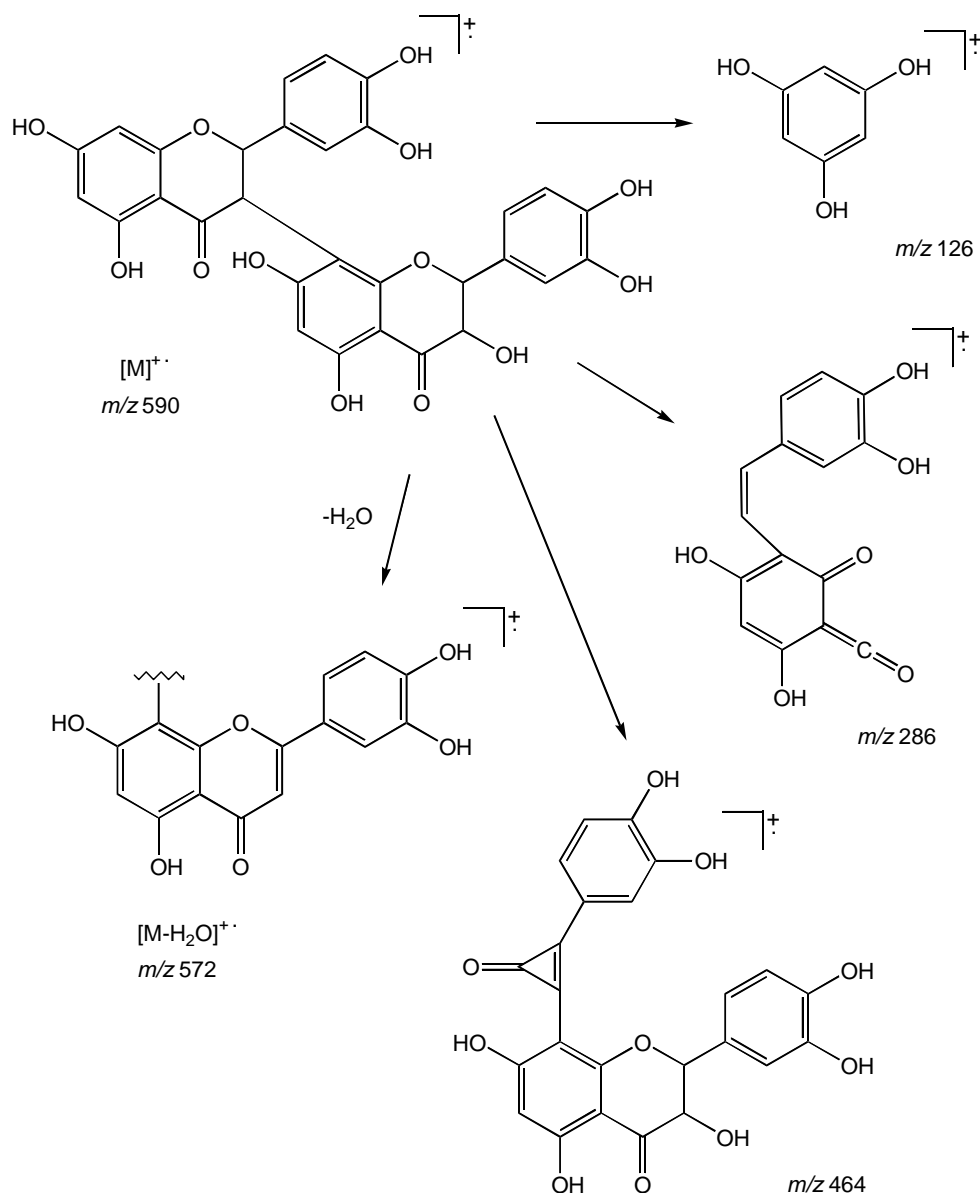


Figure 3.49 – Schéma de fragmentation EI-MS partiel de la manniflavanone d'après Crichton et Waterman (1979).

Le spectre $^1\text{H-NMR}$ dans le $\text{DMSO-}d_6$ (Figure 3.50) présente une série de signaux mal résolus, typiques des mesures à basse température effectuées sur les biflavonoïdes de la série GB (Jackson *et al.*, 1971). Ce phénomène a déjà été relevé lors de la détermination de structure des composés **D₁** et **D₂**. Les deux singulets à δ 12,18 et δ 11,83 correspondent aux protons des 2 groupes hydroxyles en C-5 et C-5'', qui forment des liaisons hydrogènes intramoléculaires avec les groupes carbonyles en C-4 et C-4'' respectivement. Le signal étendu à δ 11,4-10,6 peut être attribué aux groupes hydroxyles non chélatés de la molécule.

Le large singulet à δ 5,97 intègre pour les 3 protons aromatiques des cycles A : il s'agit en fait des deux doublets du système AB formé par les protons H-6 et H-8, masqués par le large singulet du proton H-6'' (Crichton et Waterman, 1979). Les signaux à δ 7,09-6,67 intègrent pour les 6 protons aromatiques des cycles B constituant deux systèmes ABX complexes et superposés sur le spectre. Les quatre doublets situées entre δ 5,48 et δ 4,28 ($J = 12,0$ Hz) correspondent aux protons des cycles C des unités flavanones substituées en positions 3 (Crichton et Waterman, 1979). Les valeurs des constantes de couplage vicinales de 12,0 Hz indiquent qu'au sein des paires H-2/H-3 et H-2''/H-3'', les protons ont des positions relatives *trans* diaxiales (Karplus, 1963).

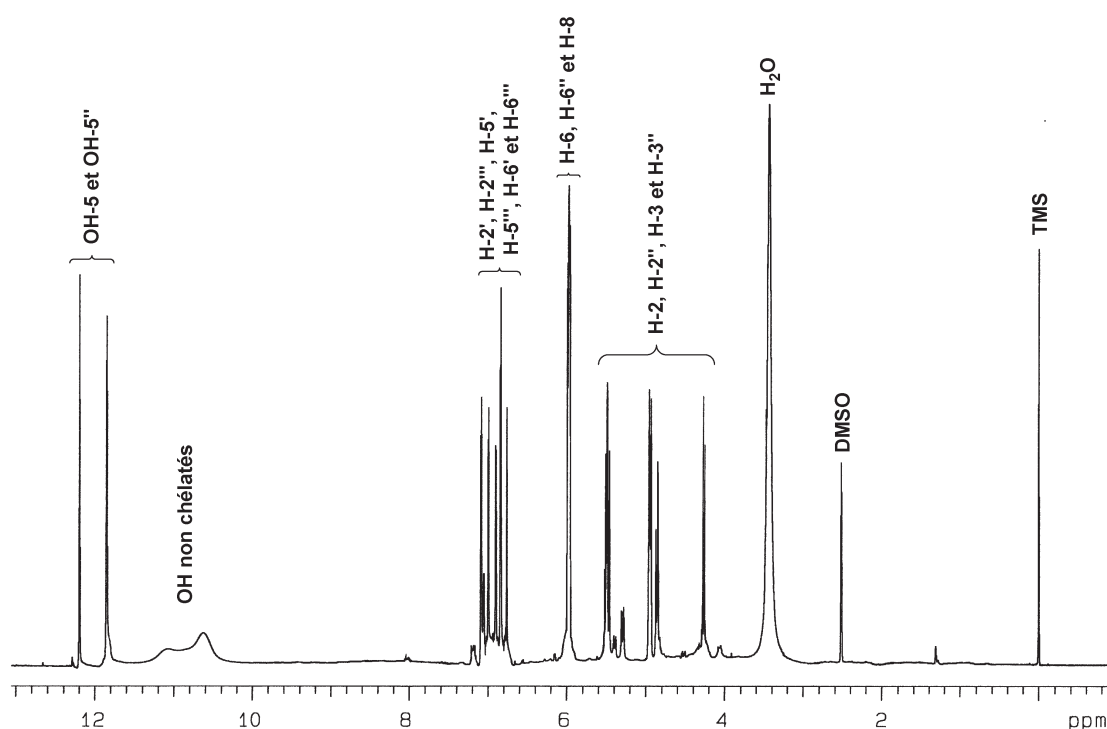


Figure 3.50 – Spectre ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé G.

Le spectre ^{13}C -NMR dans le $\text{DMSO-}d_6$ (Figure 3.51) présente, outre un signal à δ 197,2 pour les deux groupes carbonyles en C-4 des deux unités flavanone, un intense signal à δ 145,7 confirmant la présence de carbones aromatiques quaternaires *ortho*-substitués (C-3', C-3'', C-4' et C-4''). Les résonances caractéristiques des carbones tertiaires des cycles B à δ 119,6 (C-6' et C-6'') et 114,9 (C-2', C-2'', C-5' et C-5'') confirment une 3',4'-dihydroxy substitution de ces cycles (Wenkert et Gottlieb, 1977).

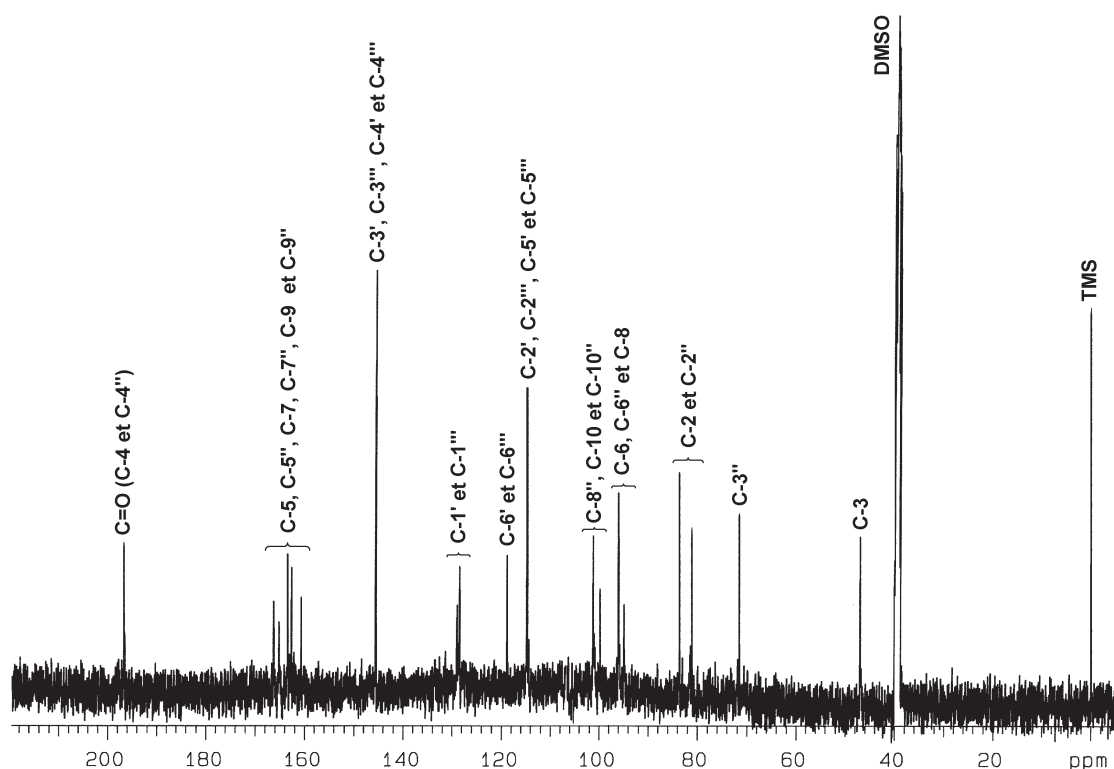


Figure 3.51 – Spectre ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé **G**.

Une des difficultés du point de vue structural, a été de confirmer la liaison 3,8'' entre les monomères. En effet, il n'a pas été possible d'attribuer de manière univoque les déplacements chimiques des carbones 6'' et 8'' sur la base des expériences de NMR menées sur le composé **G**. Cependant, Duddeck *et al.* (1978) ont montré que les substituants méthoxyles *ortho*-disubstitués des flavonoïdes présentent des résonances au-dessus de δ 59,5 et non à δ 55-57 comme pour les substituants non encombrés stériquement. C'est pourquoi le composé **G** a été perméthylé (*cf.* 5.7.2) et le spectre ^{13}C -NMR mesuré dans le $\text{DMSO-}d_6$ (Figure 3.52). L'attribution des pics supplémentaires a été permise grâce à une expérience de corrélations homonucléaires NOESY. On voit que les signaux correspondant aux 8 groupes méthoxyles aromatiques se situent en dessous de δ 57. S'il s'agissait d'un 3,6''-biflavonoïde, le groupe méthoxyle en 5'' serait *ortho*-disubstitué et par conséquent déblindé. Comme ce n'est pas le cas, la liaison entre les deux monomères doit donc être entre C-3 et C-8''.

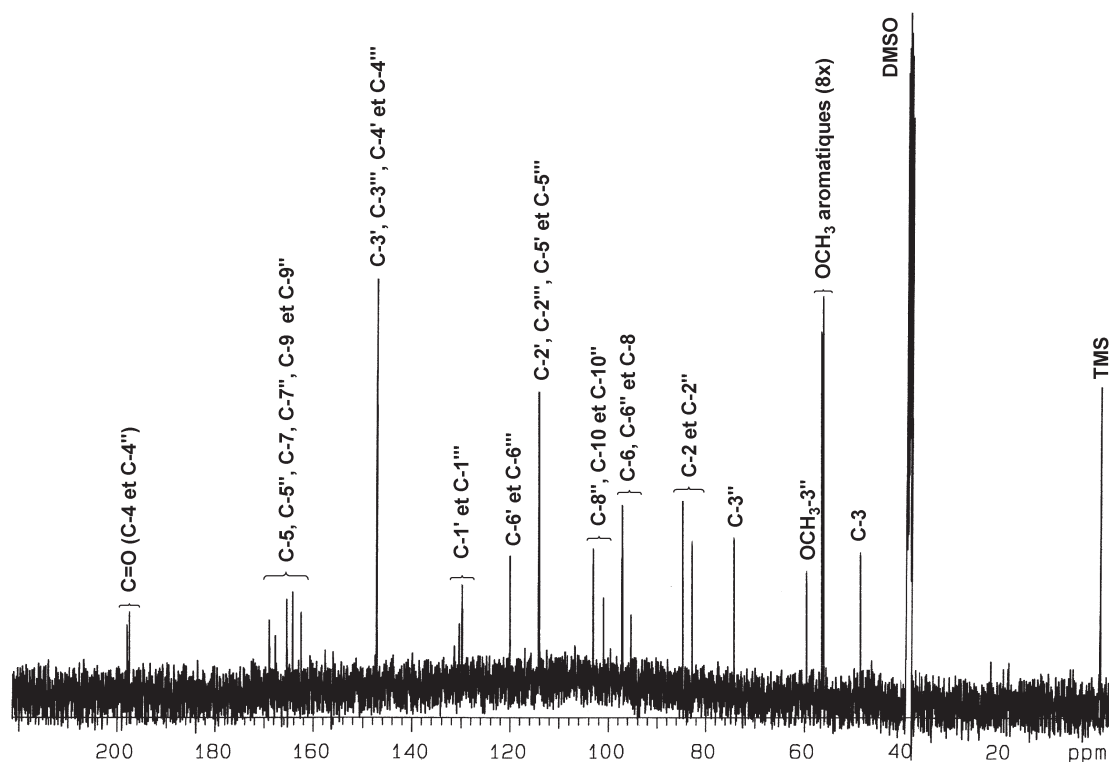
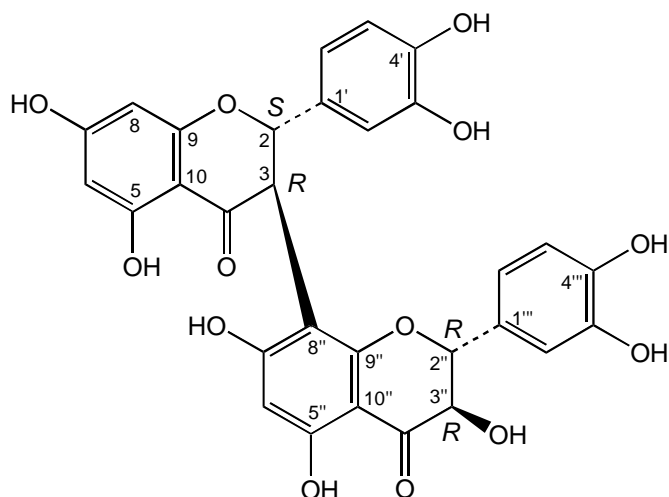


Figure 3.52 – Spectre ^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) du composé **G** nonaméthylé.

Au vu des différentes données spectrales discutées ci-dessus, le composé **G** a pu être identifié comme étant la manniflavanone, un 3,8''-biflavonoïde isolé à l'origine dans l'écorce de la tige de *Garcinia mannii* Oliv. (Clusiaceae) (Crichton et Waterman, 1979). Quelques années plus tard, Iwu *et al.* (1990) ont isolé la même molécule des racines de *G. kola* Heckel et proposé, sur les bases d'analyses par dichroïsme circulaire, la stéréochimie suivante : 2*S*, 3*R*, 2''*R*, 3''*R*. Dans le même travail, ce groupe de recherche a également isolé un épimère, la garciniflavanone (2*R*, 3*S*, 2''*R*, 3''*R*), qui se distinguerait aisément de la manniflavanone par la présence d'un maximum supplémentaire à 250 nm sur le spectre UV. Il est cependant étonnant d'observer une différence aussi marquée entre les spectres UV de diastéréoisomères de ce type. Finalement, relevons que la manniflavanone est un isomère de position du composé **D**, pour lequel nous avons également observé l'épimérisation des carbones en positions 2 et 3.



Composé G :

***3',3'',3''',4',4'',5,5'',7,7''-nonahydroxy-
3,8''-biflavanone (manniflavanone)***

3.4.8 De la biosynthèse des xanthones

La présence simultanée de la mangiférine et des composés **A** et **B** dans *Gnidia involucrata* est intéressante, car il a été montré très tôt que les benzophénones sont les précurseurs biosynthétiques des xanthones (Atkinson *et al.*, 1968). D'après Carpenter *et al.* (1969), les xanthones des végétaux supérieurs sont issues des voies du « shikimate » et de l'« acétate », qui mènent à la formation d'un intermédiaire benzophénonique. Ce dernier va finalement se cycliser, par couplage oxydatif, pour former le squelette dibenzo- γ -pyrone caractéristique de cette classe de métabolites secondaires.

En règle générale, les xanthones sont formées par cyclisation des benzophénones résultant de l'addition de trois unités dicarboxées (malonyl-CoA) sur un précurseur en C₆-C₁ dérivé de la

phénylalanine (Gupta et Lewis, 1971). Dans le cas des C-glycosylxanthones cependant, la benzophénone intermédiaire est formée par condensation d'une unité *p*-coumarate (C₆-C₃) avec 2 unités malonyl-CoA (Franz et Grün, 1983). Ce dernier chemin biosynthétique est analogue à celui des flavonoïdes, pour la formation desquels 3 unités malonyl-CoA et une unité *p*-coumarate sont impliquées (Swain, 1975). D'ailleurs, la distribution des C-glycosylxanthones dans le règne végétal est plus proche de celle des flavonoïdes que de celle des autres xanthones et il n'est pas rare de les voir accompagner, ou remplacer, des C-glycosylflavones dans le métabolisme secondaire de certaines plantes (Hostettmann et Wagner, 1977).

La Figure 3.53 montre la biosynthèse de la mangiférine comme exemple et on peut y voir que sa C-glycosylation se déroule au stade de la maclurine, *i.e.* avant la cyclisation comme le démontrent les travaux d'Inoue et Fujita (1974 et 1977) sur l'incorporation de précurseurs radiomarqués. En comparaison, la O-glycosylation semble généralement se faire après la cyclisation (Peters *et al.*, 1998).

Le mécanisme de cyclisation intramoléculaire de l'intermédiaire benzophénonique est toujours sujet à discussion, mais plusieurs voies ont été suggérées. Deux voies alternatives de la biosynthèse des xanthones dans des cultures de cellules de *Centaurium erythraea* Rafn. (Gentianaceae) et *Hypericum androsaemum* L. (Clusiaceae) ont été récemment rapportés (Beerhues, 1996 ; Schmidt et Beerhues, 1997). Dans la première, l'intermédiaire 2,3',4,6-tétrahydroxybenzophénone a subi un couplage intramoléculaire pour donner la 1,3,5-trihydroxyxanthone, alors que dans la deuxième, c'est l'isomère 1,3,7-trihydroxyxanthone qui est formé. Ces couplages oxydatifs régiosélectifs, faisant intervenir des intermédiaires radicalaires, sont catalysés par des xanthone synthases, appartenant certainement à la famille des cytochrome P₄₅₀ oxydases (Peters *et al.*, 1998).

Chez les 2,2'-dihydroxybenzophénones, la cyclisation pourrait se produire par déshydratation entre les groupes hydroxyles des cycles dérivés du shikimate et de l'acétate, via des intermédiaires tels que des O-pyrophosphates (Carpenter *et al.*, 1969 ; Sultanbawa, 1980). Cependant, ce mécanisme de déshydratation n'a jamais pu être mis en évidence *in vivo*.

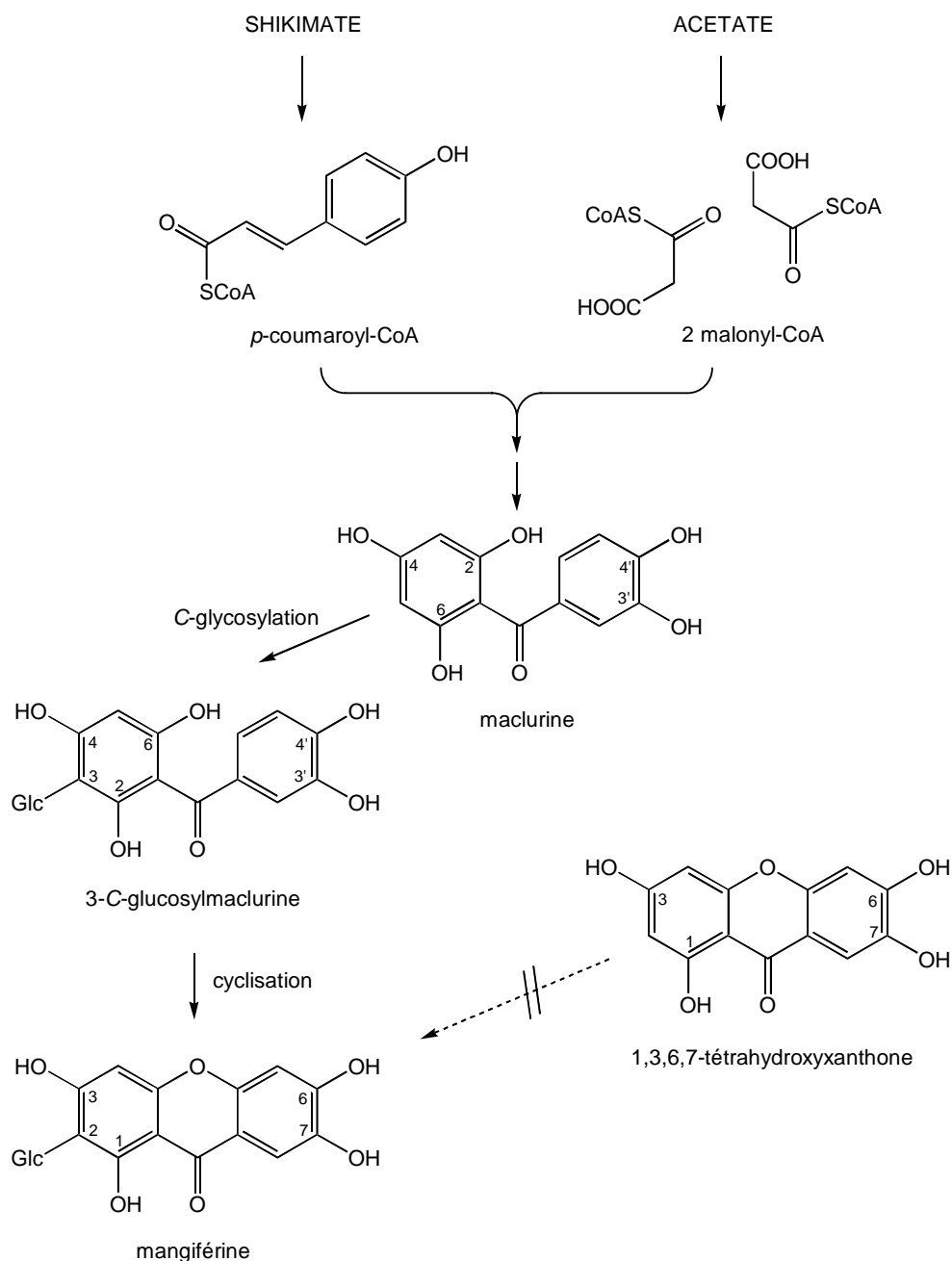


Figure 3.53 – Voie de biosynthèse postulée de la mangiférine via la maclurine (Franz et Grün, 1983).

Très récemment, Kitanov et Nedialkov (2001) ont isolé des parties aériennes de *Hypericum annulatum* Moris (syn. *H. degenii* Born., Clusiaceae) la seconde *O*-glycosylbenzophénone connue à ce jour : la 2'-*O*-glucosyl-2,4,5',6-tétrahydroxybenzophénone, baptisée hypéricophénonoside. Les auteurs ont également montré que ce nouveau produit naturel pouvait être le précurseur biosynthétique de la gentiséine (1,3,7-trihydroxyxanthone), également présente dans la plante, car ils ont pu obtenir cette dernière par simple hydrolyse,

acide ou enzymatique, de l'hypéricophénonoside (Figure 3.54). Ce résultat a permis à Kitanov et Nedialkov de postuler une nouvelle voie métabolique pour la formation de xanthones, faisant intervenir une *O*-glycosidation précoce lors de la biosynthèse de l'intermédiaire benzophénonique, comme dans le cas des *C*-glycosylxanthones. Ils en ont conclu que certaines xanthones sont probablement formées *in vivo* par déshydratation spontanée de 2,2'-dihydrobenzophénones, lequel mécanisme pourrait être régulé par la déglucosylation de ces précurseurs *O*-glycosylés en *ortho* par rapport à la fonction carbonyle.

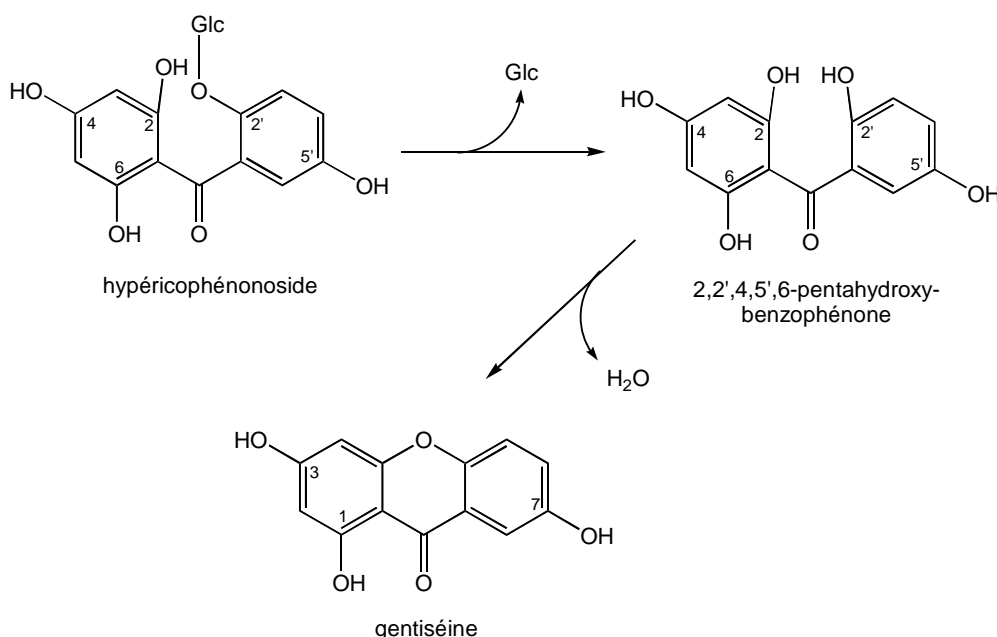


Figure 3.54 – Voie de biosynthèse postulée de la gentsine (Kitanov et Nedialkov, 2001).

La découverte du composé **B**, première *O*-glycosylbenzophénone mise en évidence dans le règne végétal, pourrait être expliquée par la voie biosynthétique proposée par Kitanov et Nedialkov. Cependant, dans notre cas, nous n'avons pas affaire à une 2,2'-dihydrobenzophénone après hydrolyse et il ne peut donc pas se produire la déshydratation spontanée décrite auparavant. La cyclisation, si elle a lieu, doit donc se faire de manière enzymatique *in vivo* (p. ex. : xanthone synthase).

Le fait que les composés **A** et **B** soient des constituants majoritaires du métabolisme secondaire de *G. involucrata* peut suggérer que les benzophénones ne sont pas seulement des produits intermédiaires dans la biosynthèse des xanthones, mais qu'elles ont peut-être un rôle

propre à jouer. Les investigations phytochimiques menées n'ont pas permis de mettre en évidence les xanthones résultant d'une cyclisation des composés **A** et **B**. La première serait la 3-C-glucosyl-1,2,4,6-tétrahydroxyxanthone et la seconde la 1,6-dihydroxy-3-méthoxyxanthone, deux composés qui n'ont encore jamais été rencontrés dans la nature.

Pour étayer la relation biosynthétique entre les xanthones polyhydroxylées et les benzophénones polyhydroxylées, Atkinson et Lewis (1969) ont mis au point des méthodes d'hémisynthèse en utilisant divers agents oxydants (permanganate, ferricyanure ou persulfate de potassium). Les conditions opératoires ont été bien définies, mais les rendements sont décevants et les réactions non sélectives, ce qui amène à la formation de mélanges d'isomères après cyclisation.

Les benzophénones prénylées, comme par exemple les guttiférones des Clusiaceae, ne sont pas rares dans le règne végétal. Il est à relever que Gustafson *et al.* (1992) ont montré que ces molécules possèdent une prometteuse activité inhibitrice du virus de l'immunodéficience humaine (HIV). A ce jour cependant, hormis le composé **A**, seules quelques C-glycosylbenzophénones ont été mises en évidence dans *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) (Tanaka *et al.*, 1984) et le composé **B** fait partie des 2 seules O-glycosylbenzophénones isolées. La présence simultanée de ces benzophénones simples (non prénylées) et de la mangiférine dans *G. involucrata* est donc d'une grande valeur du point de vue chimiotaxonomique et biogénétique.

3.4.9 Evaluation quantitative du pouvoir antioxydant des composés isolés

Lors du criblage biologique et biochimique préliminaire (*cf.* 3.3) les extraits polaires des racines et des parties aériennes de *G. involucrata* ont montré des résultats positifs intéressants au test antiradicalaire avec le DPPH sur TLC (Cuendet *et al.*, 1997). L'activité des composés isolés **A-G** a donc été déterminée quantitativement en solution sur le même radical (Cavin *et*

al., 1998). Le mode opératoire détaillé figure sous 5.5.2 et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3.8.

Pour être complets, précisons que tous les autres tests utilisés en routine dans notre laboratoire ont été menés sur les produits isolés dans le cadre du présent travail, mais qu'aucun autre résultat positif, en justifiant une évocation plus détaillée, n'est apparu.

Tableau 3.8 – Activités réductrices des composés A-G sur le radical DPPH en solution.
Mesures spectrophotométriques effectuées à 517 nm, 30 min après l'ajout du réactif.

Concentration [μM]	Réduction du radical DPPH [%]*								
	A	B	C	D	E	F	G	BHT**	Q**
80,0	22,8	1,0	93,9	95,1	5,4	7,2	96,0	31,6	96,6
40,0	15,9	0,0	76,6	81,9	4,1	4,6	91,5	16,4	95,8
20,0	12,0	0,0	48,3	49,4	3,9	3,8	59,8	13,6	95,4
10,0	7,5	0,0	25,0	30,2	3,4	3,2	33,1	9,7	55,6
5,0	3,6	0,0	5,9	17,5	2,8	2,5	20,8	5,9	23,2
2,5	2,8	0,0	7,3	11,6	2,5	2,1	14,7	4,5	15,3

* calculée selon la formule indiquée sous 5.5.2 à partir de la moyenne de 3 mesures

** composés de référence (BHT : butylhydroxytoluène = E 321 ; Q : quercétine)

On voit d'après ce tableau que les composés **C**, **D** et **G** ont de fortes activités antiradicalaires, comparables à celle de la quercétine. Le composé **A** montre une activité moyenne, du même ordre que le butylhydroxytoluène utilisé dans l'industrie alimentaire (E 321), alors que les composés **B**, **E** et **F** ont des activités faibles, voire inexistantes.

Concernant les flavonoïdes, trois critères structuraux importants pour l'activité antiradicalaire ont été mis en évidence lors d'études de relations structure-activité (Bors et Saran, 1987 ; Bors *et al.*, 1990) : (a) la substitution *o*-dihydroxyle du noyau B, (b) la double liaison entre C-

2 et C-3 conjuguée avec la fonction cétone en C-4, et (c) la présence de groupes hydroxyles en C-3 et C-5. Ceci explique les fortes activités des biflavonoïdes **D** et **G**, possédant les critères structuraux a et c, et de la quercétine, réunissant les trois critères. La yuankanine (**F**) ne présente que le critère b, alors que l'astragaline (**E**) ne possède qu'une partie du critère c (OH en C-5), ce qui explique les faibles activités de ces composés naturels. Au vu de ces résultats, on mesure l'importance majeure de la structure catéchol du noyau B et de l'hydroxylation en position C-3 pour l'activité antioxydante, comme l'ont montré Morel *et al.* (1993).

Les propriétés antioxydantes des xanthones ne sont étudiées que depuis une dizaine d'années, époque du premier travail de Sato *et al.* (1992) décrivant l'important effet antiradicalaire de la mangiférine (**C**). Depuis lors, des études systématiques ont permis de montrer que nombre de ces polyphénols ont des propriétés antiradicalaires et inhibitrices de la peroxydation des lipides. Ainsi, douze xanthones isolées de *Garcinia subelliptica* Merrill (Clusiaceae) ont été évaluées pour les activités inhibitrice de la lipoperoxydation et antiradicalaires sur les radicaux superoxyde et DPPH (Minami *et al.*, 1994 et 1995). Les xanthones possédant une substitution *o*-hydroxyle, comme la mangiférine (**C**), ont montré les effets inhibiteurs les plus puissants dans les trois tests.

L'activité non négligeable de la benzophénone **A** est certainement due au schéma de substitution hydroquinonique de l'un de ses cycles. En effet, les travaux de Cotelle *et al.* (1991) sur les hydroquinones isolées de l'organisme marin *Aplidium californicum*, montrent que ces molécules possèdent des propriétés antiradicalaires sur le radical superoxyde. Finalement, l'activité presque nulle observée pour la benzophénone **B** peut s'expliquer par l'absence de tous les schémas structuraux décrits ci-dessus comme favorisant l'effet antioxydant.

3.4.10 Mise en évidence de C-glycosylflavones par LC/APCI-MSⁿ

Comme nous l'avons vu précédemment, les C-glycosylxanthones possèdent un métabolisme et une distribution similaires aux C-glycosylflavones. C'est pourquoi nous avons mené une analyse par LC/APCI-MS (ions positifs ; cf. 5.2.3) sur les extraits méthanoliques exempts de tanins des racines et des parties aériennes de *G. involucrata*. L'utilisation d'un gradient MeCN-H₂O (+ 0,05 % TFA) linéaire de 5:95 à 80:20 en 50 min a permis de révéler dans les deux extraits des pics à m/z 449 et m/z 433, montrant des spectres UV-visible caractéristiques de flavonoïdes (Markham, 1982). Des pertes de 90 Da et 120 Da dans les spectres LC/MS ont suggéré la présence de C-glycosides (Rath *et al.*, 1995). Sur la base de ces données préliminaires, ces pics ont pu être attribués aux C-glycosylflavones ubiquitaires orientine, vitexine ou à leurs isomères. Pour caractériser complètement et sans ambiguïté ces composés *on-line*, une expérience complémentaire LC/APCI-MSⁿ (ions positifs ; cf. 5.2.3) a été réalisée avec les paramètres opératoires suivants :

- échantillon : 20 µl de solution à 1 mg/ml d'extrait ;
- colonne : Symmetry C₁₈ (4 µm ; 300 x 4,0 mm d.i. ; Waters) équipée d'une pré-colonne Guard-Pak C₁₈ (Waters) ;
- phase mobile : MeCN-H₂O 14:86 (+ 0,05 % TFA) à un débit de 1 ml/min ;
- détection UV : trace LC/UV à 366 nm relevée avec un détecteur à barrettes de diodes (190-500 nm) ;
- séquence MSⁿ : un balayage (*scan*) MS complet (MS¹) est suivi de l'isolement et de la fragmentation des ions [M+H-120]⁺ (m/z 313 et m/z 329) dans le piège d'ions, puis de leur détection (MS²) ;

Dans ces conditions, il a été montré que l'on pouvait distinguer les isomères de position des C-glycosylflavones (Rath *et al.*, 1995 ; Wolfender *et al.*, 1999). La Figure 3.55 regroupe les données obtenues pour les parties aériennes de *G. involucrata*, mais l'étude des racines a amené aux mêmes résultats. Sur les traces d'ion sélectives (*Selective Ion Monitoring*, SIM) de cette analyse LC/MS isocratique, on peut voir un pic (**H**) avec un ion moléculaire protoné

à m/z 449 et deux pics (**I** et **J**) avec des ions $[M+H]^+$ à m/z 433, enregistrés à 17 min, 31 min et 33 min respectivement.

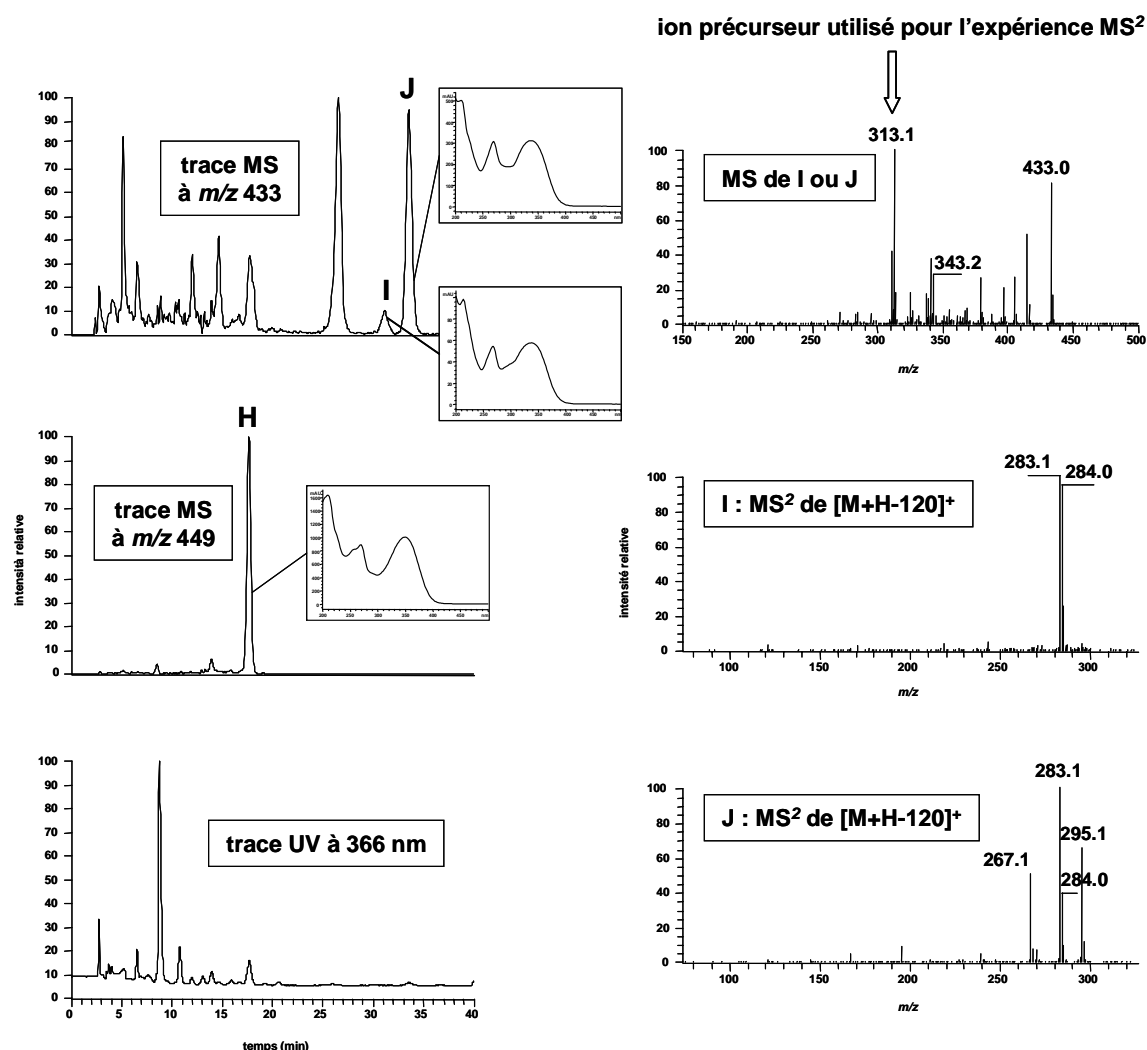


Figure 3.55 – Analyse LC/UV/APCI-MSⁿ de l'extrait méthanolique exempt de tanins de *G. involucrata*.
Conditions expérimentales décrites dans le texte.

Comme l'ont décrit récemment Wolfender *et al.* (1999), les données LC/APCI-MS des ions $[M+H]^+$ des isomères **I** et **J** sont similaires et montrent des pertes caractéristiques de 90 Da et 120 Da, alors que les analyses MS² sur les ions $[M+H-120]^+$ de ces deux isomères révèlent des différences très claires. Ainsi, la MS² sur l'ion $[M+H-120]^+$ du composé **J** présente des ions à m/z 295, m/z 284, m/z 283 et m/z 267, caractéristiques de pertes de 18 Da ($-H_2O$), 29 Da ($-CHO$), 30 Da ($-CHO$, $-H$), et 46 Da ($-CO$, $-H_2O$). Par contre, la MS² sur l'ion $[M+H-120]^+$ du composé **I** ne montre que des pertes de 29 Da et 30 Da (Figure 3.55). En

comparaison avec des résultats obtenus pour les composés de référence et les données de la littérature (Waridel *et al.*, 2001 ; Figure 3.56), le spectre MS^2 du composé **I** est caractéristique d'une C-glycosylflavone substituée en C-8, alors que le spectre MS^2 du composé **J** correspond à son isomère substitué en C-6. Par conséquent, les composés **I** et **J** ont été identifiés comme étant respectivement la vitexine et l'isovitexine.

Le flavonoïde possédant un ion $[M+H]^+$ à m/z 449 (**H**), présente un spectre MS^2 de son ion $[M+H-120]^+$ avec les mêmes pertes que pour le composé **J** et a été identifié comme étant l'isoorientine. Aucune trace d'orientine n'a été détectée.

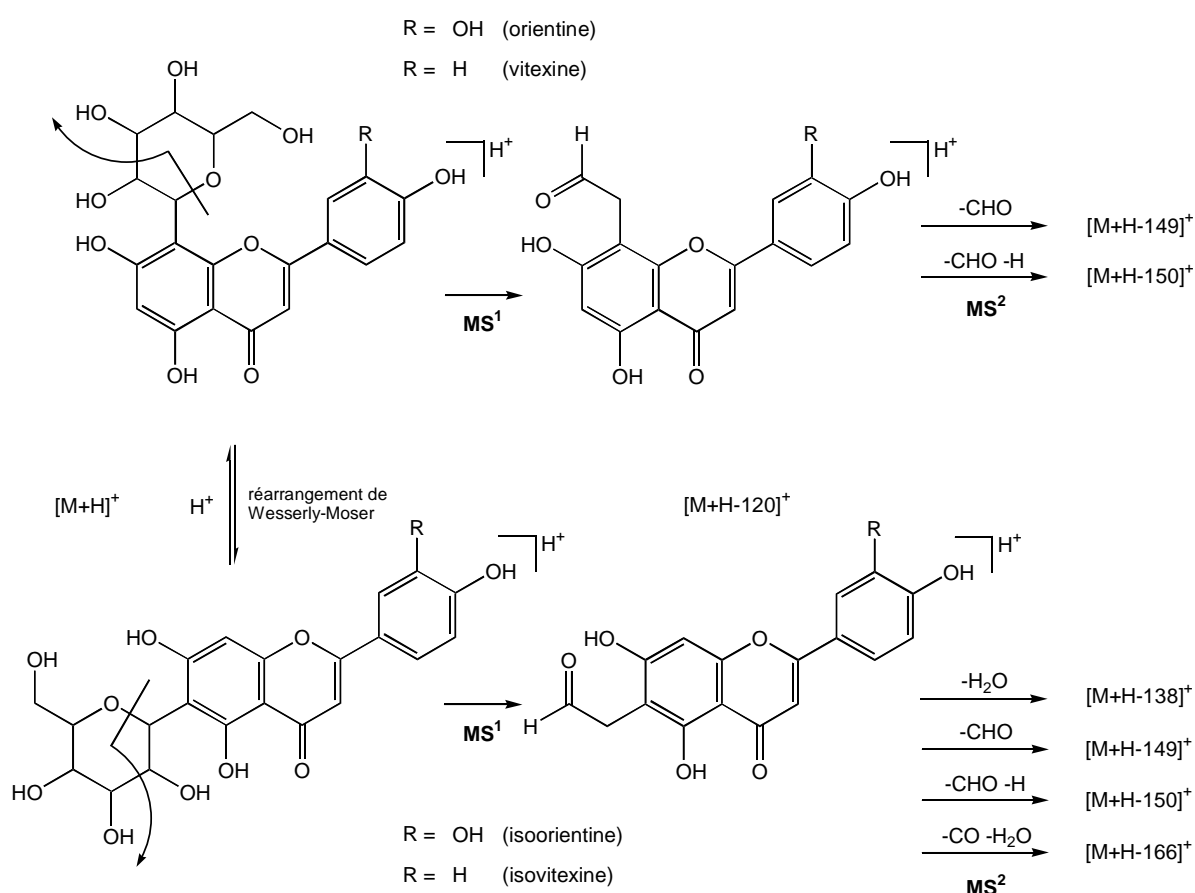


Figure 3.56 – Différenciation d'isomères de C-glycosylflavones *on-line* par LC/APCI-IT- MS^n (ions pos.) (Waridel *et al.*, 2001).

Le pic à 27 min (Figure 3.55) présente également un ion à m/z 433, mais son ion $[M+H]^+$ est à m/z 451. Dans ce cas, l'ion à m/z 433 est certainement le résultat d'une perte d'eau ($[M+H-H_2O]^+$). Une aglycone protonée à m/z 289 ($[M+H-162]^+$) et les données UV

enregistrées *on-line* permettent de soupçonner une structure de *O*-glycosylflavone. Néanmoins, ces seuls indices ne permettent pas d'identifier complètement ce composé.

Quelques travaux d'isolement classique ont déjà mis en évidence des *C*-glycosylflavones chez certaines Thymelaeaceae : l'isovitexine dans *Daphne sericea* Vahl (Ulubelen *et al.*, 1982), l'orientine dans *D. gnidium* L. (Cabrera et García-Granados, 1981) et l'orientine et l'isovitexine dans *Thymelaea tartonraira* L. (García-Granados et Sáenz de Buruaga, 1980c). C'est cependant la première fois que l'isoorientine est détectée dans une Thymelaeaceae. Comme nous avons relevé l'importance des *C*-glycosides en tant que marqueurs chimiotaxonomiques, l'existence d'une méthode rapide, sensible et fiable permettant de les mettre en évidence *on-line* offre des perspectives intéressantes dans l'optique de la classification des Thymelaeaceae.

3.4.11 Développement d'une méthode LC/¹H-NMR pour l'évaluation rapide de la composition chimique d'un extrait brut

Cette partie a pour but de mettre en exergue les potentiels de la LC/NMR (*cf.* 5.2.4) dans l'analyse d'extraits bruts et de montrer les possibilités de développement qui existent dans ce domaine. Cette méthode très récente a déjà fait l'objet de quelques articles-revue montrant ses applications actuelles et futures, mais également ses limitations (Hostettmann *et al.*, 1999 ; Wolfender *et al.*, 1998 et 2001).

La détection NMR *on-line* est un apport inestimable à l'analyse phytochimique, car elle enrichit nettement les faisceaux de preuves amenant à l'identification partielle, voire complète, de constituants d'échantillons végétaux, sans qu'il soit nécessaire de les isoler préalablement (*dereplication*). Il s'agit donc d'une méthode complémentaire à toutes les techniques de couplage existantes (LC/UV/MS, LC/IR, LC/CD).

La Figure 3.57 présente un montage de LC/NMR, tel que nous l'utilisons dans notre laboratoire.

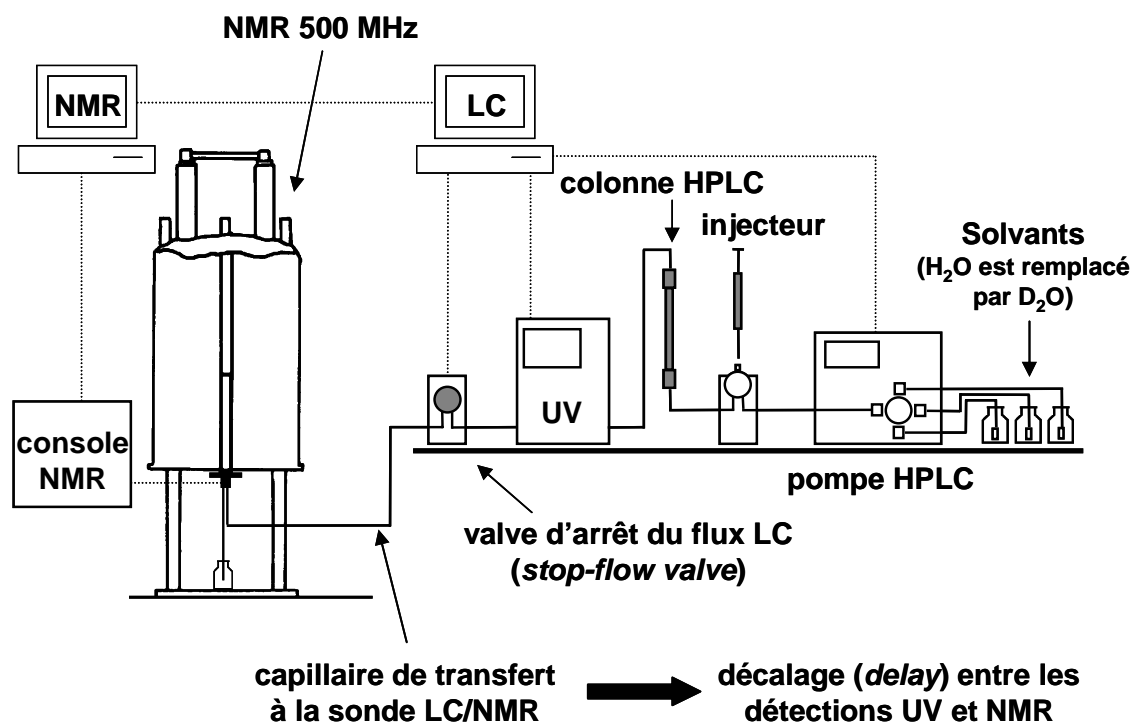


Figure 3.57 – Montage typique utilisé pour des expériences LC/NMR *on-flow* et *stop-flow* d'après Wolfender *et al.* (1998). L'ordinateur qui pilote le système LC assure le contrôle de la pompe HPLC et le déclenchement de la valve d'arrêt du flux et de la station responsable de l'acquisition des données NMR.

Comme outil de *dereplication*, la LC/NMR est actuellement encore limitée par son manque relatif de sensibilité, particulièrement pour la détection des noyaux à faible abondance isotopique (p. ex. ^{13}C). De plus, la séparation LC ne peut se faire qu'avec des solvants organiques non-deutériés, pour des raisons financières évidentes. Ceci rend nécessaire la suppression des signaux des solvants par des séquences d'impulsions calibrées, mis au point par les fabricants de logiciels pour NMR, avec le risque de perdre des informations importantes. Les développeurs d'instrumentation de NMR étudient constamment la manière de rendre ces séquences de suppression plus efficaces, tout en travaillant à la conception d'aimants supraconducteurs plus puissants (jusqu'à 900 MHz actuellement) et de sondes LC/NMR mieux adaptées à cette application moderne.

De son côté, le phytochimiste peut intervenir en usant de divers artifices permettant de contourner les problèmes liés à la sensibilité de ce type de détection. C'est cette approche particulière qui sera démontrée plus loin, avec l'exemple de l'analyse de l'extrait

méthanolique des parties aériennes de *G. involucrata*. Les 3 moyens suivants peuvent être envisagés en première intention :

- augmentation de la quantité d'échantillon introduite ;
- augmentation du nombre de cycles de mesure par spectre (*scans per increment*) ;
- arrêt du flux LC sur les pics d'intérêt.

Dans le cas de l'analyse d'extraits bruts en particulier, ces solutions se heurtent à l'extrême complexité des échantillons. En effet, la résolution de la séparation LC diminue avec l'augmentation de la quantité injectée. De plus, certains constituants de faible solubilité pourraient précipiter en tête de colonne. Il s'agit donc de trouver les conditions optimales, permettant d'obtenir une détection améliorée sans pour autant trop dégrader la résolution LC. La Figure 3.58 présente cette problématique dans le cas de l'analyse de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *G. involucrata*.

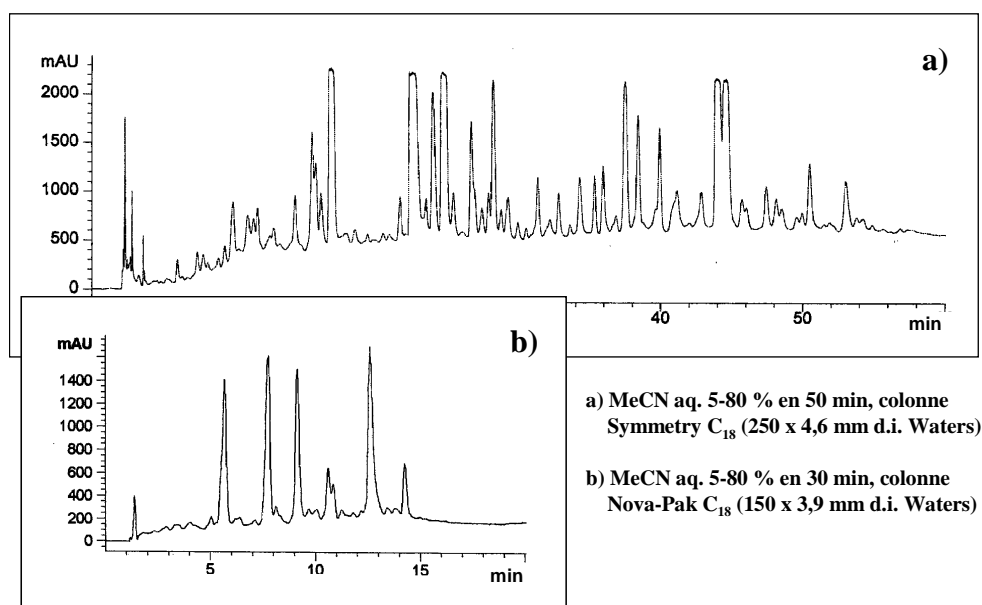


Figure 3.58 – Chromatogrammes LC/DAD-UV à 210 nm de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Gnidia involucrata* suite à l'injection de 100 µg (a) et 10 µg (b) d'échantillon.

On voit clairement qu'en augmentant la quantité d'échantillon introduite, il est nécessaire d'étendre le gradient d'élution, mais aussi de travailler avec des colonnes plus longues ou de conception différente, comme par exemple les colonnes à compression radiale.

L'augmentation du nombre de cycles de mesures en NMR permet d'améliorer la résolution de la détection, mais influence aussi directement les temps d'acquisition de chaque spectre. Dans le cas de l'analyse d'extrait complexes en flux LC continu, cette solution augmente donc le risque d'obtenir des signaux de mélanges et n'est donc pas satisfaisante dans le cadre d'une étude *on-line* des spectres NMR des constituants minoritaires.

Il existe 2 approches générales pour effectuer des expériences LC/NMR, qui impliquent l'acquisition des données spectrales en flux LC continu (*on-flow*) ou en flux interrompu (*stop-flow*). Le Tableau 3.9 montre les caractéristiques de chacune de ces 2 types de procédures d'après Wolfender *et al.* (1998).

Tableau 3.9 – Comparaison entre les modes *on-flow* et *stop-flow* en LC/NMR.

mode <i>on-flow</i>	mode <i>stop-flow</i>
- détection rapide	- nécessité de longs temps d'acquisition
- faible sensibilité (20 µg/pic à 500 MHz)	- sensibilité plus élevée
- bonne conservation des performances HPLC	- dégradation des performances HPLC (diffusion)
- limité à la LC/ ¹ H-NMR 1D	- possibilités d'expériences 2D ! (p. ex. HSQC)
- système de contrôle HPLC indépendant	- contrôle centralisé de la HPLC et de la NMR

En mode *stop-flow* classique, la valve d'arrêt du flux est déclenchée par la détection de pics d'une intensité donnée, réglée par l'utilisateur. Cependant, dans le cas de mélanges complexes comme les extraits bruts, l'automatisation du déclenchement de la valve par l'intermédiaire de l'intensité du signal UV s'avère très difficile. Pour illustrer ce propos, la Figure 3.59 présente une analyse LC/NMR *on-flow* sur *G. involucrata*, qui met en évidence l'importante saturation du détecteur UV.

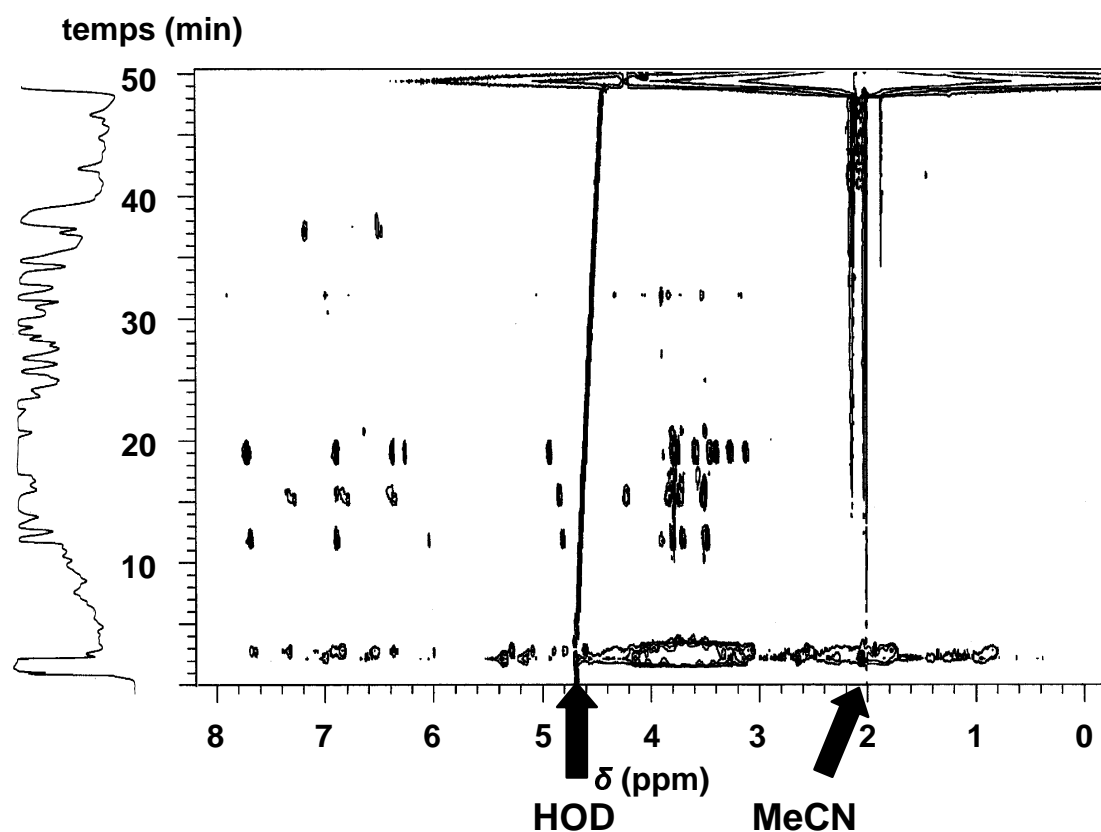


Figure 3.59 – Chromatogramme LC/ ^1H -NMR *on-flow* bidimensionnel de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Gnidia involucrata*. Conditions HPLC : 20 mg injectés ; col. à compression radiale $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ (10 μm ; 100 x 8,0 mm d.i. ; Waters) ; gradient MeCN- D_2O 5:95 \rightarrow 20:80 en 50 min ; flux à 1 ml/min. Conditions LC/NMR : 32 scans/spectre, cellule de mesure de 60 μl (3 mm d.i.), 500 MHz.

Il apparaît qu'en mode *on-flow* seuls les spectres ^1H -NMR des constituants majoritaires de la plante ont un seuil de détection satisfaisant, même après injection de 20 mg d'échantillon (dissous dans 100 μl de DMSO) ! La trace UV est nettement saturée en de nombreux points, ce qui rend irréalisable l'entreprise d'une analyse *stop-flow* contrôlée par ce mode de détection. C'est pourquoi nous avons envisagé l'utilisation d'un protocole différent, développé à l'origine pour la vérification de la pureté des pics LC/UV par RMN. Cette méthode consiste à interrompre le flux LC à intervalles de temps réguliers (p. ex. 1 min), afin de permettre l'acquisition d'un grand nombre de données NMR. Ce principe de « découpage » du temps d'analyse (*time slicing*), qui permet de nous affranchir d'une automatisation hasardeuse de la valve d'arrêt du flux, est expliqué dans la Figure 3.60.

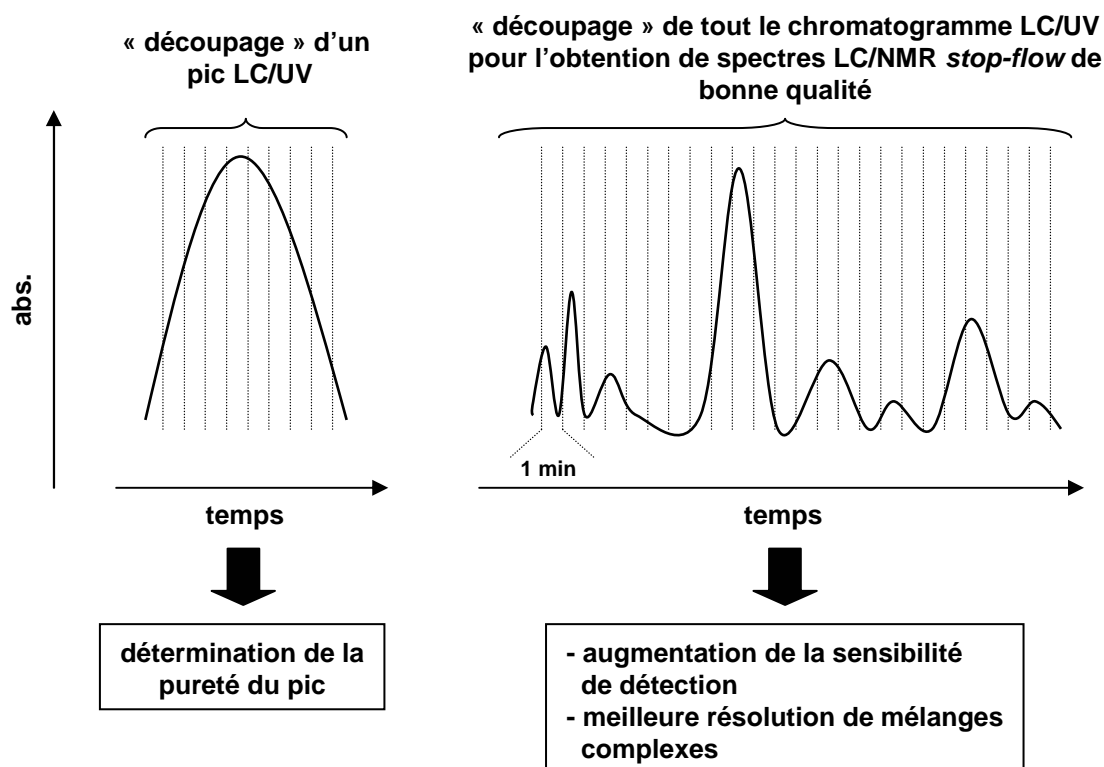


Figure 3.60 – Principe de l'analyse LC/NMR *stop-flow* par « découpage » (*time slicing*).

Les traits verticaux représentent les endroits où le flux a été interrompu pour permettre l'acquisition des données NMR.

Grâce à cette approche, il est possible d'améliorer sensiblement la qualité et la quantité des informations obtenues en LC/NMR, comme le montre la Figure 3.61. Il s'agit du résultat de l'analyse LC/NMR *time-slice* du même échantillon qu'auparavant, injecté en quantité identique. Bien que le gradient ait été réglé sur une base de 50 min, le flux a été interrompu chaque minute pour permettre l'acquisition de 1024 données ^1H -NMR incrémentées pendant env. 17 min. Ceci explique l'étendue de l'échelle du temps de plus de 12 h.

La comparaison avec la Figure 3.59 nous montre qu'une vingtaine de spectres ^1H -NMR ont un seuil de détection satisfaisant, contre 4 lors de l'analyse *on-flow*. Pour illustrer le gain en informations par la méthode *time-slice*, la Figure 3.62 montre le cas de 2 constituants de *G. involucrata* : la benzophénone **B**, dont le spectre ^1H -NMR présente un rapport signal/bruit nettement amélioré, et l'isoorientine (**J**), dont l'identification était impossible dans les conditions *on-flow*. Rappelons cependant que le recours à la MS^n est indispensable pour différencier l'isoorientine de son isomère *C*-glucosylé en position 8 (*cf.* 3.4.10).

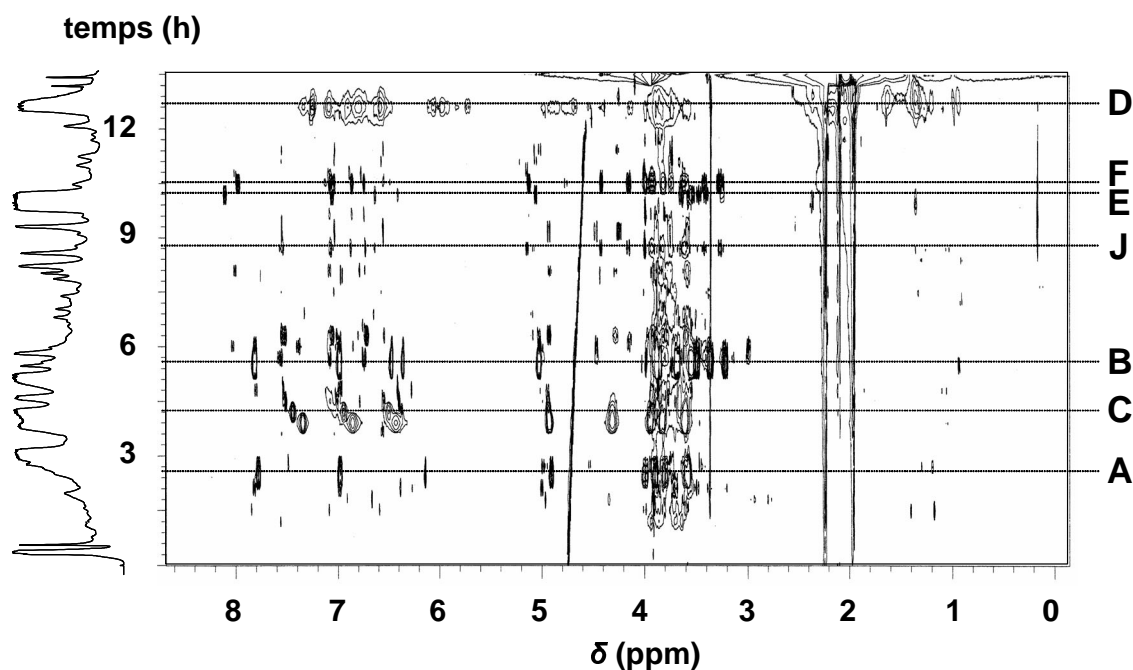


Figure 3.61 – Chromatogramme LC/ ^1H -NMR *time-slice* bidimensionnel de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Gnidia involucrata*. Conditions HPLC identiques à celles décrites pour la Figure 3.59, sauf que le flux est interrompu toutes les minutes pour permettre l'acquisition des données NMR. Conditions LC/NMR : 1024 scans/spectre (env. 17 min), cellule de mesure de 60 μl (3 mm d.i.), 500 MHz.

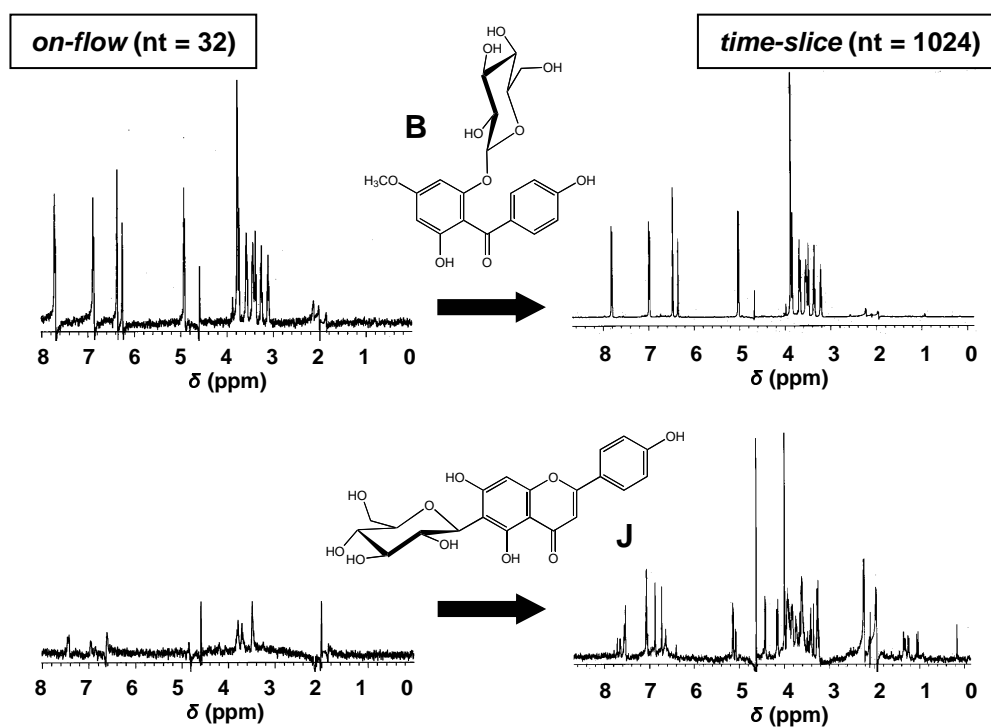


Figure 3.62 – Comparaison des spectres obtenus par analyse LC/ ^1H -NMR *on-flow* et *time-slice* des composés B et J dans l'extrait méthanolique des parties aériennes de *G. involucrata*.

A la lumière de ces résultats, il est clair que des informations structurales provenant d'autres méthodes spectrales sont nécessaires pour une identification complète *on-line*. Sur cette base, on peut donc raisonnablement s'interroger sur la faisabilité de couplages analytiques multiples en série. En effet, l'un des problèmes récurrents lorsque l'on utilise plusieurs méthodes couplées en parallèle est la localisation des pics dans leur trace UV respective. Pour illustrer clairement ce point, la Figure 3.63 représente des traces UV enregistrées lors d'analyses LC/NMR et LC/MS du même échantillon. L'intérêt de cet exemple est double, car il compare 2 méthodes qui ont de nombreuses applications complémentaires en analyse phytochimique, mais qui présentent des sensibilités distinctes d'un facteur 10^3 - 10^4 ! On voit donc que le fait d'injecter de grandes quantités d'échantillon pour améliorer la détection rend plus difficile la localisation précise des constituants minoritaires dans le chromatogramme et augmente le chevauchement des pics.

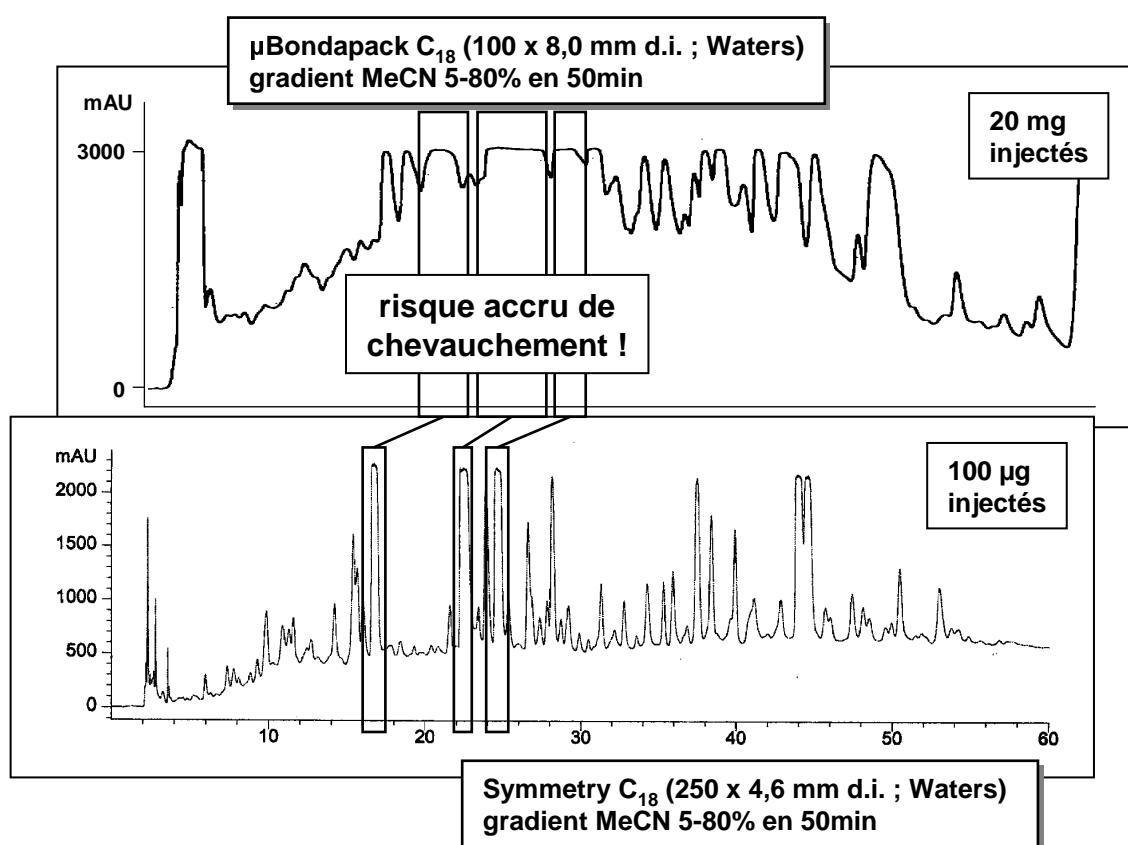


Figure 3.63 – Comparaison des traces LC/UV à 210 nm enregistrées lors d'analyses LC/NMR (haut) et LC/MS (bas) de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Gnidia involucrata*.

Dans l'hypothèse d'un couplage multiple en série, tel que schématisé dans la Figure 3.64, il faut garder à l'esprit que les limites de chaque technique compromettront l'efficacité des autres. Ainsi, les grandes quantités d'échantillon qu'il faut injecter pour une bonne détection NMR dégraderont nettement les performances des autres techniques spectroscopiques couplées. De plus, le besoin en solvants deutériés pour les expériences LC/NMR est particulièrement problématique pour une interprétation fiable des données MS de composés inconnus. En effet, certains produits naturels possèdent des atomes d'hydrogène labiles, qui vont s'échanger avec des atomes de deutérium apportés par la phase mobile LC/NMR et provoquer une transposition du spectre MS. Bien que la deutérioration puisse amener quelques informations structurales, il est nécessaire de mener des expériences d'échange inverse D/H (*back-exchange*), afin de comparer les données en milieu deutérié et non-deutérié (Sandvoss *et al.*, 2000).

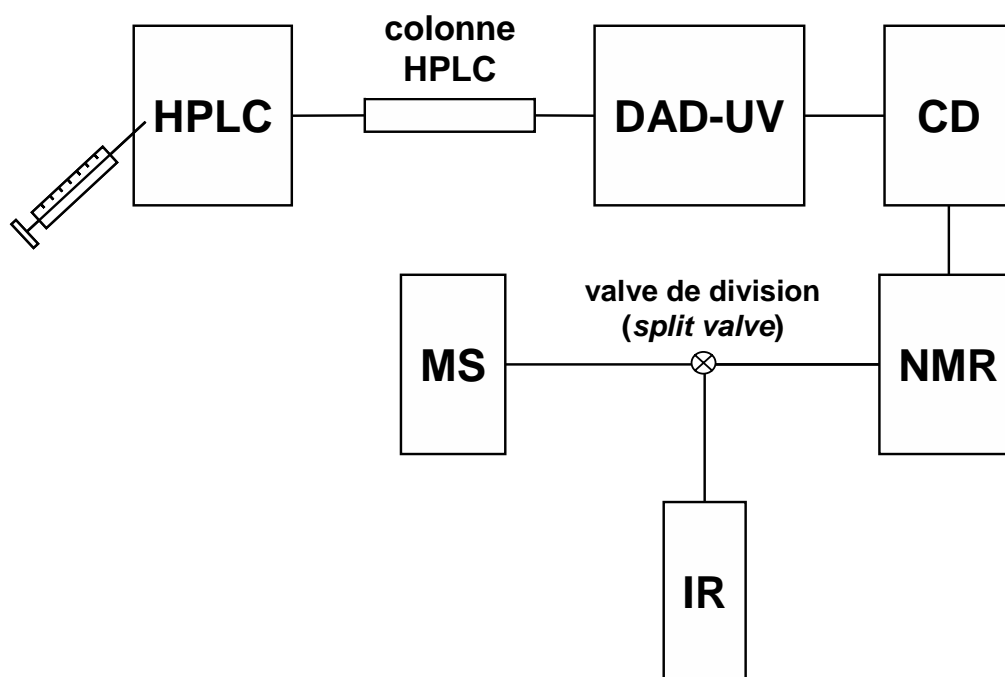


Figure 3.64 – Schéma théorique d'un couplage multiple en série pour la caractérisation *on-line* complète des constituants d'un mélange.

Ces considérations nous amènent à proposer pour des applications en phytochimie un système de couplage multiple semi-automatisé, tel que celui qui se trouve dans la Figure 3.65. Comme la MS est une méthode sensible ne nécessitant que peu de matériel, des tests

biologiques sur les fractions issus de la séparation LC/NMR peuvent également être envisagés. A titre d'exemples, les protocoles des tests antiradicalaire et fongicides en solution sur microplaques ne nécessiteraient que de menues adaptations pour être intégrés à un tel système. L'utilisation d'un dispositif de dépôt automatique des fractions sur TLC permettrait en outre l'utilisation d'une large gamme de détecteurs chimiques, biochimiques ou biologiques.

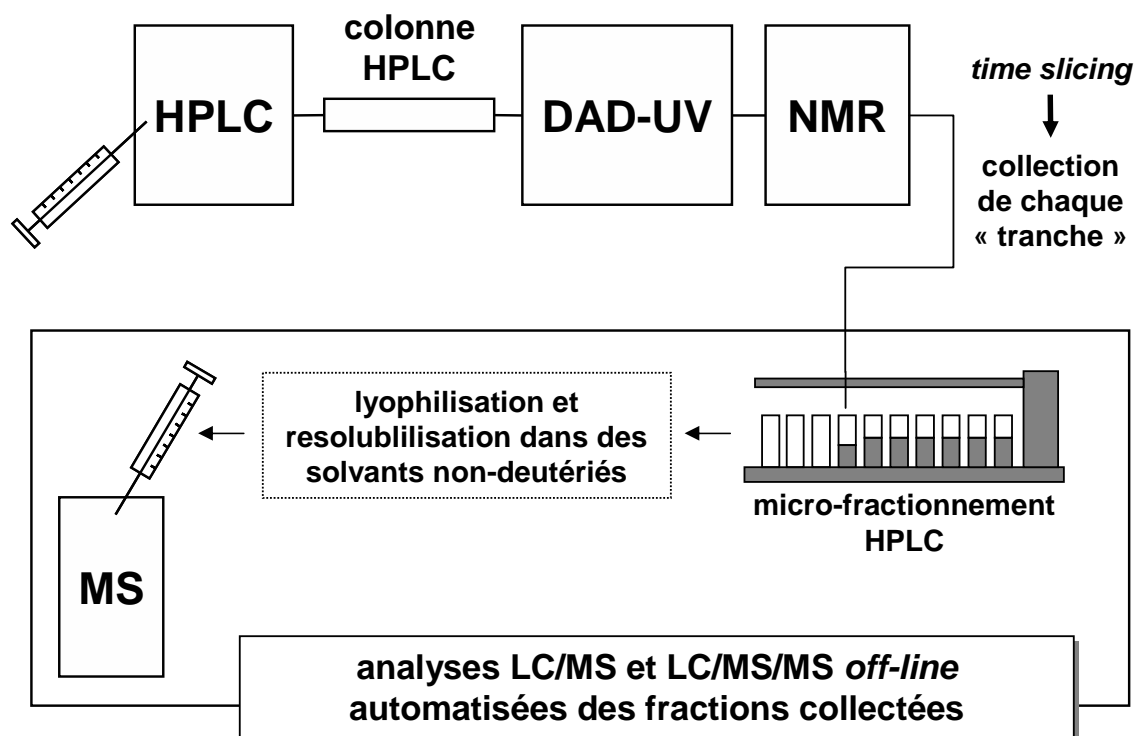


Figure 3.65 – Schéma proposé d'un couplage semi-automatisé entre la LC/NMR et l'analyse *off-line* par LC/MS et LC/MS/MS.

Notons finalement que si la méthode LC/NMR *time-slice* s'avère très prometteuse dans le cadre d'une caractérisation complète *on-line* des constituants d'extraits bruts, d'autres approches plus courtes ont été proposées dans la littérature récente. Hansen *et al.* (1999) ont utilisé une méthode très pratique lors d'une étude sur l'identification *on-line* des constituants d'*Hypericum perforatum* (Clusiaceae). Celle-ci consiste à faire une séparation par HPLC en récoltant les pics d'intérêt dans une boucle collectrice (*loop collector*) déclenchée par une méthode de détection sensible (UV ou MS), sans qu'il soit nécessaire d'interrompre le flux LC. Les contenus de la boucle sont ensuite récupérés et peuvent être analysés

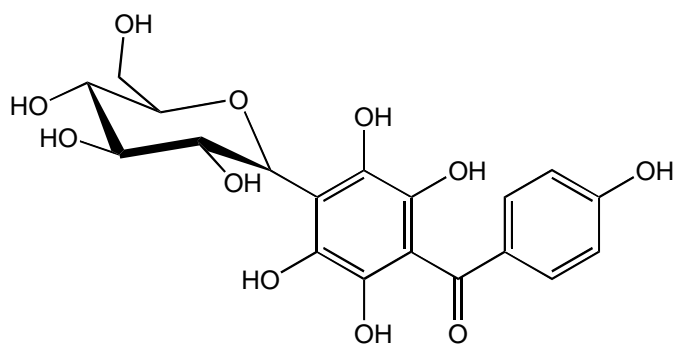
automatiquement *off-line* à l'aide de différentes techniques spectrales, comme la NMR 1D ou 2D, la MS ou encore la MS/MS. Cette méthode a l'avantage de permettre d'obtenir des informations sur des produits minoritaires en procédant à des expériences complémentaires adaptées à chaque cas, sans influencer le déroulement de la séparation. Cependant, elle fait à nouveau intervenir le déclenchement délicat, par une méthode de détection très sensible, d'une valve pour la collection des pics. Une autre méthode avec laquelle il serait très intéressant de comparer le protocole *time-slice* est celle décrite par Sandvoss *et al.* (2000). Pour l'identification *on-line* des stéroïdes oligoglycosylés de l'étoile de mer (*Asterias rubens*), ils ont procédé à une expérience LC/NMR *on-flow* en travaillant avec un flux LC très faible (50 µl/min). Cette approche ne résout pas le problème du temps d'analyse élevé en mode *time-slice*, mais elle a le mérite de ne nécessiter aucune automatisation.

4 Conclusion et perspectives

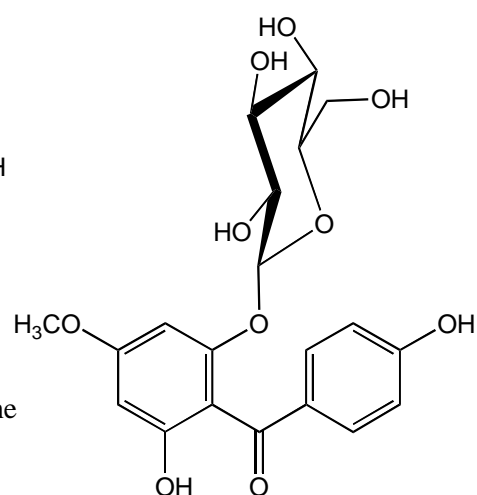
Au cours du présent travail de thèse, ayant pour but de mieux connaître les Thymelaeaceae au travers de l'étude de leur métabolisme secondaire, 30 extraits bruts provenant de 8 espèces africaines de la famille ont été évalués à l'aide de méthodes de criblage chimique et biologique. La première découverte intéressante, découlant du criblage chimique préliminaire par LC/UV, a été la mise en évidence de nombreuses substances à caractère xanthonique. Jusqu'alors, aucune mention n'a été faite dans la littérature de la présence de cette classe de métabolites secondaires chez les Thymelaeaceae.

Les tests de détection des activités antiradicalaire et inhibitrice de l'acétylcholinestérase ont amené les résultats les plus prometteurs lors du criblage préliminaire sur TLC. Les premiers ont pu être affinés par l'étude quantitative opérée en solution sur les composés isolés. Ce sont les biflavonoïdes **D₁**, **D₂** et **G** et la mangiférine (**C**) qui se sont révélés les plus actifs contre le radical DPPH, avec des propriétés comparables à celles de la quercétine, mais beaucoup plus puissantes qu'un antioxydant utilisé dans l'industrie alimentaire (E 321). La mise en évidence d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase dans les extraits des Thymelaeaceae étudiées n'a par contre pas pu être approfondie, car ce test n'a été introduit que très récemment dans notre laboratoire. Ce résultat est digne d'intérêt, car les Thymelaeaceae ne contiennent aucun alcaloïde, classe généralement responsable des effets anticholinestérasiques observés dans les extraits végétaux étudiés (Marston *et al.*, 2002). L'acétylcholinestérase est une enzyme impliquée dans certains troubles neuro-dégénératifs, telle que la maladie d'Alzheimer, qui prennent une place croissante dans notre société vieillissante. C'est pourquoi cette voie devrait être explorée plus avant à la lumière des résultats obtenus. La première démarche consisterait de s'assurer que les activités observées ne proviennent pas de résidus de pesticides ayant contaminé le matériel végétal.

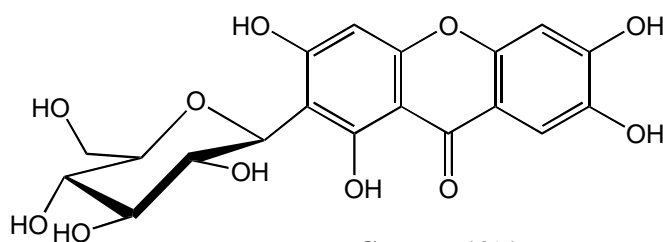
L'investigation approfondie des extraits méthanoliques des racines et des parties aériennes de *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. a été entreprise à la suite de ces démarches préliminaires, du fait de ses utilisations répandues en médecine traditionnelle africaine et de l'absence d'études phytochimiques antérieures. Cette démarche a conduit à l'isolement et à l'identification de structure de 8 constituants, dont 4 nouveaux produits naturels (Figure 4.1), appartenant tous à la famille des polyphénols issus des voies biosynthétique du shikimate et de l'acétate.



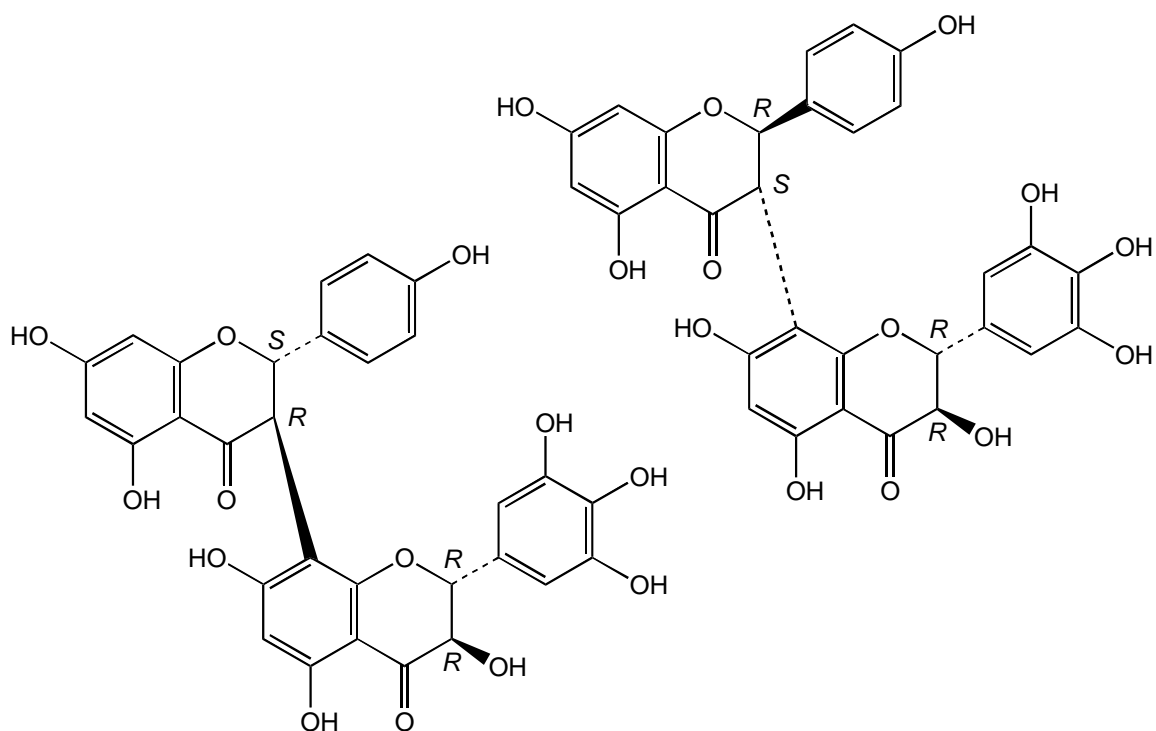
A* : 4-C-glucosyl-2,3,4',5,6-pentahydroxybenzophénone



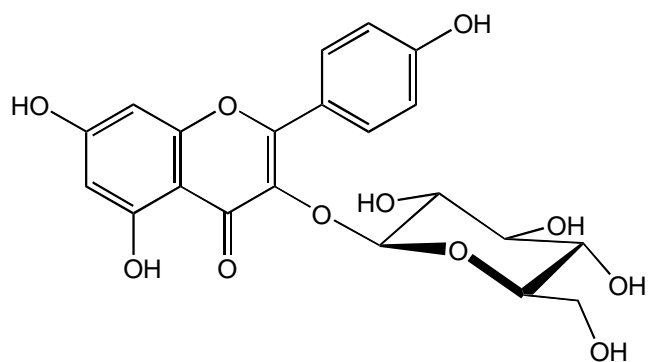
B* : 2-O-glucosyl-4',6-dihydroxy-4-méthoxybenzophénone



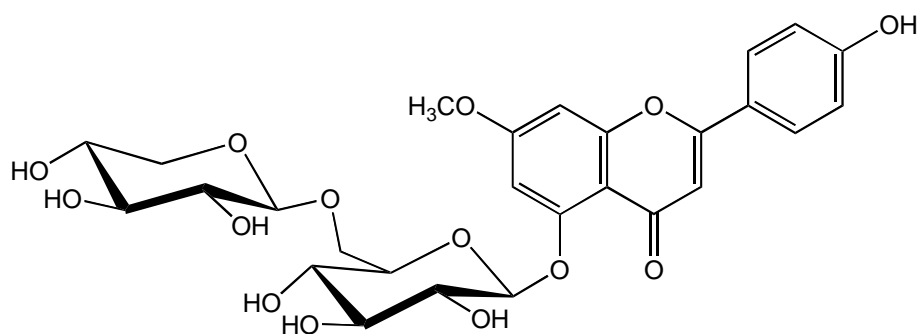
C : mangiférine



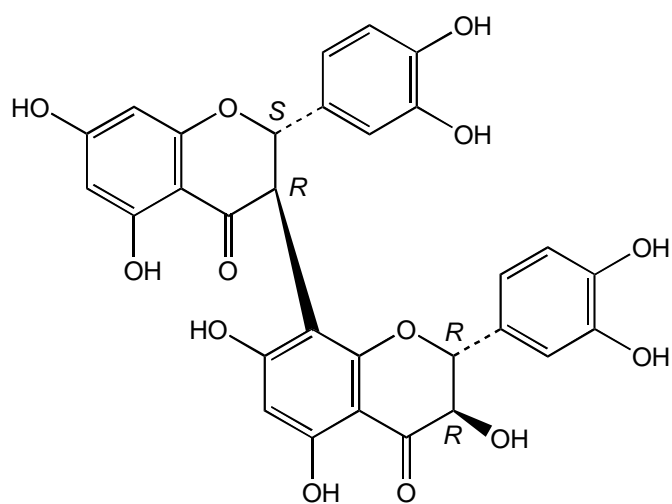
D₁*, **D₂*** : stéréoisomères respectivement 2*R*,3*S* et 2*S*,3*R* de la 3'',3''',4',4''',5,5'',5''',7,7''-nonahydroxy-3,8''-biflavanone



E : astragaline



F : yuankanine



G : mannilavanone

Figure 4.1 – Structures et noms des composés isolés dans les racines et les parties aériennes de *Gnidia involucrata*. Les astérisques désignent les produits nouveaux.

La découverte de quantités non négligeables de tanins dans les 2 extraits précités et l'allure bombée caractéristique des chromatogrammes LC/UV de tous les autres extraits polaires criblés, va à l'encontre de ce qui était généralement admis dans la littérature au sujet de la présence de cette classe de métabolites secondaires chez les Thymelaeaceae. En effet, Hegnauer (1973) et Borris *et al.* (1988) parmi d'autres, ont considéré la teneur en tanins comme l'un des critères distinguant foncièrement les Thymelaeaceae des Euphorbiaceae. Il pourrait d'ailleurs paraître étonnant que l'utilisation de certaines Thymelaeaceae sous forme de douches vaginales à effet rétrécissant n'ait pas alerté plus tôt les chercheurs. Cela serait sans considérer, comme nous l'avons déjà relevé, que l'attrait principal des études menées sur cette famille a toujours résidé dans la prometteuse classe des diterpènes irritants, offrant d'intéressantes perspectives dans la recherche anticancéreuse. Ainsi, la mise en évidence des autres classes de métabolites secondaires des Thymelaeaceae s'est généralement faite en marge de cet axe de recherche prioritaire, car les énormes quantités de matériel végétal extraites permettaient de déceler de nombreux constituants minoritaires dans les fractions cytotoxiques. Lorsque leur structure ne pouvait pas être entièrement déterminée, l'étude n'en était sans doute pas approfondie. C'est certainement ce qui explique que la présence de tanins chez les Thymelaeaceae n'ait été que rarement évoquée et si c'était le cas, on ne se risquait qu'à parler de dérivés du leucocyanidol (Hegnauer, 1973). En raison du rôle prépondérant de ces tanins dans certaines utilisations traditionnelles très répandues en Afrique (rétrécissement du vagin), il serait donc intéressant de les caractériser complètement à l'avenir.

La présence simultanée de benzophénones et de xanthones dans les extraits polaires de *G. involucrata* a été l'occasion de reconsidérer certains aspects de la biosynthèse de ces dernières. En effet, alors que les benzophénones étaient depuis longtemps déjà considérées comme les précurseurs biosynthétiques des xanthones, les processus qui amènent à leur cyclisation finale ne sont toujours pas complètement connus, mais sont certainement contrôlés par des systèmes enzymatiques, telles que les xanthone synthases (Kitanov et Nedialkov, 2001). Le fait que les benzophénones **A** et **B** soient majoritaires dans l'extrait étudié pourrait signifier que cette classe de métabolites a également un rôle propre à jouer, qui resterait encore à mettre en évidence. Il est aussi possible que leur présence abondante soit le signe d'une variabilité des systèmes enzymatiques évoqués précédemment, sous l'influence de différences saisonnières ou climatiques, ou encore d'agressions extérieures d'un autre type (herbivores,...). Ces hypothèses doivent encore être étudiées de manière plus

approfondie et systématique, par exemple par l'analyse de lots récoltés à différents moments de l'année ou dans différentes régions, ou encore par l'étude d'autres espèces et variétés de la même famille. Les Thymelaeaceae vont peut-être un jour contribuer à lever le voile sur cet aspect méconnu du métabolisme secondaire des végétaux supérieurs.

La rareté des benzophénones non prénylées, telles que les benzophénones nouvelles **A** et **B** isolées dans le présent travail, pourrait en faire des marqueurs chimiotaxonomiques de valeur. En effet, des C-glucosylbenzophénones, analogues au composé **A**, n'ont auparavant été mises en évidence que dans *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) (Tanaka *et al.*, 1984), et le composé **B** a été la première O-glucosylbenzophénone isolée dans le règne végétal. Il serait donc intéressant de pouvoir étudier de nombreux représentants de la famille des Thymelaeaceae *s.l.* par LC/UV/MS, afin de savoir si ce type de benzophénones en sont un critère commun et si les différentes sous-familles qui la composent ont également une réalité au niveau du métabolisme secondaire. Il y a quelques années, la chimiotaxonomie aurait aussi pu nous aider à conforter la position systématique des Thymelaeaceae, mais le développement récent de systèmes de classification ordinaire par l'analyse de séquence de gènes, comme celui produit par l'*Angiosperm Phylogeny Group* (APG, 1998), sont beaucoup plus fiables. En effet, alors qu'une analyse chimiotaxonomique ne prend en compte que quelques dizaines de critères (à peine plus que lors d'une étude morphologique !), l'approche phylogénétique en considère plusieurs centaines, voire milliers. Cependant, l'approche chimiotaxonomique est toujours de première importance pour le phytochimiste, car c'est de la variabilité structurale du métabolisme secondaire qu'il s'inspire principalement dans sa recherche des médicaments du futur.

L'isolement des 3,8''-biflavanones **D₁**, **D₂** et **G** est également très prometteur, car ces molécules sont analogues aux biflavonoïdes de type GB, isolés originellement dans le genre *Garcinia* (Clusiaceae) et présentant des propriétés analgésiques non négligeables (Bittar *et al.*, 2000 ; Luzzi *et al.*, 1997). Il serait donc très intéressant de soumettre ces composés, particulièrement le mélange des stéréoisomères nouveaux **D₁** et **D₂**, à des tests permettant d'évaluer leur activité antinociceptive. Parmi les protocoles algésiométriques existant, le plus fréquemment utilisé est le test de torsion (*writhing test*) visant à évaluer chez la souris les contractions abdominales induites par l'acide acétique intrapéritonéal (test chimique). Une autre solution consisterait mesurer les réponses douloureuses de la souris aux stimuli

thermiques grâce au test de battement de la queue (*tail flick test* ; test thermique). Il existe aussi des tests basés sur l'inhibition *in vitro* des cyclo-oxygénases (COX), enzymes-clef des mécanismes inflammatoires et de la douleur. Cette dernière catégorie évite dans un premier temps le recours à l'expérimentation animale, mais pose le délicat problème d'une corrélation fiable entre des résultats obtenus *in vitro* et une potentielle activité *in vivo*.

L'utilisation de la LC/MSⁿ nous a permis de mettre en évidence *on-line* 3 C-glycosylflavones connues dans les extraits méthanoliques de *G. involucrata* (Figure 4.2). Ce type d'approche est digne d'intérêt, car il s'agit d'un outil de choix pour une étude chimiotaxonomique à large échelle des Thymelaeaceae, telle que décrite auparavant.

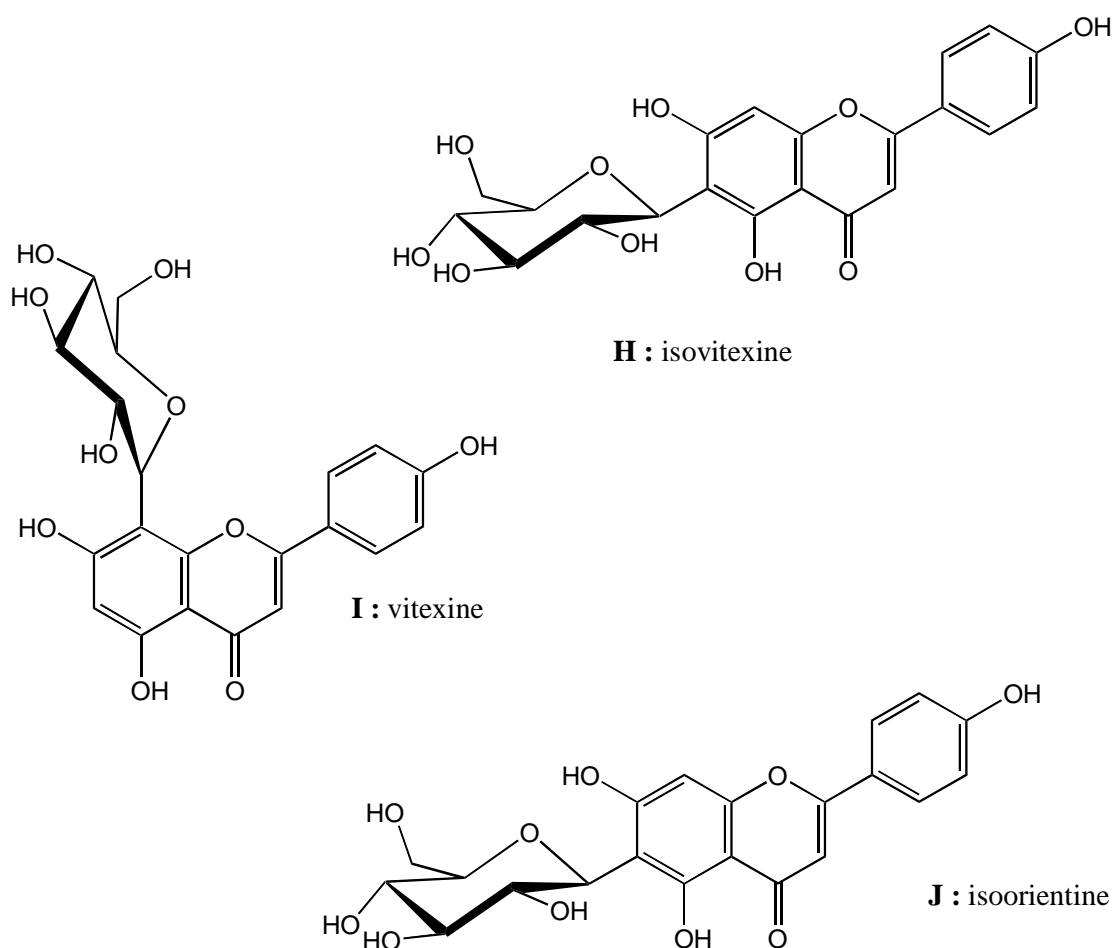


Figure 4.2 – Structures et noms des composés mis en évidence *on-line* dans les racines et les parties aériennes de *Gnidia involucrata*.

La partie consacrée au développement d'une méthode d'analyse LC/¹H-NMR *stop-flow* pour la caractérisation *on-line* des constituants d'un mélange complexe a montré les nombreuses voies d'amélioration envisageables dans ce domaine. En effet, la sensibilité de la détection NMR reste un problème qu'il faut absolument surmonter pour pouvoir bénéficier pleinement du potentiel d'informations structurales apportées par cette méthode. L'utilisation du protocole *time-slice* nous permet de faire un grand pas dans ce sens, mais au prix de longs temps d'acquisition de données, même pour des expériences LC/¹H-NMR 1D. Il est dès lors évident que la solution au problème posé passera aussi par le développement de l'instrumentation mise à disposition de l'utilisateur : aimants plus puissants, cellules de mesure LC/NMR mieux conçues et séquences de suppression de solvant optimisées. Dès lors, l'intégration de la LC/NMR dans des systèmes de couplages multiples en série sera beaucoup plus naturelle.

Les applications de méthodes analytiques couplées de pointe sont un complément indispensable à l'étude des Thymelaeaceae. En effet, cette famille méconnue doit être étudiée avec des outils modernes, permettant de tirer un grand nombre d'informations en un temps très court. De plus, de très faibles quantités de matériel végétal sont nécessaires, ce qui minimise les dommages irréversibles aux espèces étudiées. Ce point est particulièrement important en ce qui concerne les espèces menacées de disparition, comme c'est le cas pour de nombreuses Thymelaeaceae européennes. Ces méthodes offrent en outre d'intéressantes perspectives, non seulement dans le domaine de l'analyse d'extraits végétaux, mais aussi de matrices complexes en général, comme les échantillons plasmatiques ou les prélèvements tissulaires d'animaux.

5 Partie expérimentale

5.1 Matériel végétal et extraction

Les plantes étudiées dans ce travail sont toutes des Thymelaeaceae africaines. Le Tableau 5.1 présente l'origine et la date de récolte des différents échantillons naturels. Dans tous les cas, l'identification botanique a été faite en collaboration avec un botaniste local : M. S. Mavi au Zimbabwe, M. H. Patel au Malawi et MM. A.W. Owadally et M.H. Dulloo à l'Île Maurice.

Tableau 5.1 – Matériel végétal étudié.

Nom botanique	Lieu et date de récolte	Organe	Poids
<i>Dais cotonifolia</i> L.	Zimbabwe, 12/1994	feuilles	140 g
		écorce de tige	50 g
<i>Gnidia capitata</i> L.f.	Zimbabwe, 2/1996	parties aériennes	330 g
		racines	250 g
<i>Gnidia involucrata</i> Steud. ex A. Rich.	Malawi, 11/1991	parties aériennes	630 g
		racines	550 g
<i>Gnidia kraussiana</i> Meissn.	Zimbabwe, 12/1990	racines	320 g
<i>Gnidia microcephala</i> Meissn.	Zimbabwe, 11/1992	feuilles	120 g
		racines	260 g
<i>Passerina montana</i> Thoday.	Zimbabwe, 11/1992	parties aériennes	850 g
<i>Synaptolepis kirkii</i> (Oliver) Gilg	Zimbabwe, 11/1997	écorce de racine	180 g
<i>Wikstroemia indica</i> C.A. Mey.	Île Maurice, 3/1989	feuilles	280 g
		brindilles et écorce de tige	250 g

Après la récolte, le matériel végétal est étendu sur place en couche fine pour qu'il sèche à l'air libre. Ensuite, il est conditionné sous forme de drogue séchée, avant d'être envoyé à l'Institut de Pharmacognosie et Phytochimie (IPP) où il est conservé en atmosphère contrôlée (21 °C, faible humidité ambiante) jusqu'à ce qu'il soit étudié. Les précautions qui viennent d'être décrites permettent de minimiser les divers mécanismes de fermentation et de dégradation inhérents au caractère organique de ces matières premières.

Dans notre laboratoire, la première étape dans la préparation d'extraits végétaux est le broyage du matériel végétal en présence d'azote liquide (N₂), afin d'éviter toute dégradation thermique. Sous cette forme broyée, la drogue présentera une plus grande surface de contact avec les solvants extracteurs, permettant ainsi d'améliorer le rendement des extractions.

La méthode d'extraction de routine que nous employons est la macération successive par deux solvants de polarité croissante : le dichlorométhane et le méthanol. La drogue broyée est d'abord mise en contact avec le dichlorométhane à raison de 1,5 l de solvant pour 250 g de drogue. Après 24 h d'agitation mécanique à température ambiante, le mélange hétérogène est filtré sur filtre de papier plissé (Schleier & Schuell) et le résidu est à nouveau extrait 2 fois 24 h dans les mêmes conditions. Les filtrats sont réunis, le solvant évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor ; max. 40 °C) et le résidu sec lyophilisé et pesé : on parle alors d'extrait brut dichlorométhanique (DCM). Le résidu non extractible au dichlorométhane est traité de la même manière avec 3 extractions successives au méthanol. Après réunion des filtrats, évaporation du solvant et lyophilisation, on obtient l'extrait brut méthanolique (MeOH) qui est pesé à son tour.

Des préparations en médecine traditionnelle bien définies pour certaines plantes nous ont incités à préparer pour celles-ci des extraits bruts aqueux (H₂O) ou alcooliques (EtOH 25 %). La procédure générale est la même que celle décrite plus haut, mais nous avons utilisé 500 ml de solvant (eau ou éthanol à 25 %) pour 50 g de drogue broyée. Dans le cas de l'extraction par l'eau, il est important de favoriser un contact intime entre la drogue et le solvant par un court passage initial du mélange dans un bain à ultrasons.

5.2 Techniques de séparation analytiques

5.2.1 Chromatographie sur couche mince (TLC)

Une plaque de chromatographie sur couche mince (TLC, CCM en français) se compose d'un support, en aluminium ou en verre, sur lequel a été étendue une fine couche d'un milieu de sorption (p. ex. la silice, SiO_2) comme phase stationnaire. Ces plaques sont plongées d'environ 0,5 cm dans une phase mobile. Cette dernière est généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, adapté au type de séparation recherché. Les composés déposés à environ 1 cm du bas de la plaque sont alors humectés et dissous par la phase mobile qui progresse par capillarité le long de la phase stationnaire. Selon la nature des phases mobile et stationnaire, deux types de mécanismes d'interaction permettent la séparation de composés présents en mélange : l'adsorption sur la surface de la phase stationnaire solide et le partage entre un film de phase stationnaire liquide et la phase mobile (Pachaly, 1999).

Pour les analyses de routine par TLC, nous utilisons généralement des plaques de Silicagel 60 F₂₅₄ prêtes à l'emploi à support en aluminium (Merck) et celles-ci sont développées dans des cuves en verre conventionnelles (Camag), dont l'atmosphère aura préalablement été saturée en vapeurs de la phase mobile. Les systèmes de solvants les plus couramment employés dans notre laboratoire sont les suivants :

- extraits DCM : ligroïne-AcOEt (1:1)
- extraits MeOH : CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:35:5)

Ces compositions ne sont bien sûr qu'indicatives et sont souvent adaptées aux besoins spécifiques d'une analyse.

Du fait de ses faibles contraintes techniques, de son emploi simple et de son coût relativement modeste, la TLC est un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que de produits purs isolés. Les quantités déposées sur les plaques sont normalement de 100 µg pour les extraits et de 10 µg pour les produits purs.

Il s'agit également d'un support facilement utilisable pour caractériser ultérieurement des substances par leurs réactivités chimiques ou leurs activités sur certaines cibles biologiques. Ces aspects seront traités plus loin aux chapitres 5.5 et 5.6.

L'incorporation dans la phase stationnaire des plaques du commerce de produits permettant la visualisation des composés UV-actifs à 254 nm et 366 nm, augmente le seuil de détection des produits à faible activité spectrale dans le domaine du visible (env. 450-700 nm).

5.2.2 Chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV-visible à barrettes de diodes (LC/DAD-UV)

La technique de séparation la plus appréciée en analyse phytochimique est la chromatographie liquide à haute performance (pression), abrégée HPLC (CLHP en français). Les mécanismes de base permettant de séparer des produits en mélange sont les mêmes que ceux décrits ci-avant. L'immense avantage de la HPLC par rapport à la chromatographie sur couche mince réside dans l'amélioration sensible des paramètres de seuil de détection et de résolution de séparation, ainsi que dans les possibilités d'automatisation du procédé. Un montage de HPLC classique comprend les éléments suivants (Harris, 1995) :

- un système de pompage (simple ou multiple) pour déplacer la phase mobile à haute pression (plusieurs dizaines de bars) ;
- un injecteur (manuel ou automatique) pour introduire l'échantillon, solubilisé dans un solvant adéquat et exempt de particules en suspension, dans le système à haute pression ;
- une colonne contenant la phase stationnaire polaire (phase normale) ou apolaire (phase inverse) ;
- un détecteur (universel ou sélectif) ;
- une interface permettant de visualiser les signaux enregistrés par le détecteur (intégrateur ou logiciel informatique).

Dans notre institut, nous sommes équipés de chromatographes HP-1050, 1090 series II et 1100 de la marque Hewlett-Packard pour les analyses LC/DAD-UV (simples ou avec dérivation post-colonne). Ces appareillages, pilotés par le logiciel HP ChemStations, permettent de travailler en mode isocratique (composition constante de la phase mobile) ou en mode gradient (phase mobile de composition variable en cours d'analyse).

L'acronyme DAD désigne le détecteur à barrettes de diodes (*Diode Array Detector*). Ce dernier est constitué de barrettes constituées de plusieurs centaines de diodes au silicium (un semi-conducteur), mélangé à des éléments du groupe III (p. ex. : Ga) ou V (p. ex. : As) pour améliorer sa conductivité. Plusieurs barrettes de diodes placées dans le plan focal d'un monochromateur à réseau peuvent contrôler simultanément une vaste gamme de longueurs d'ondes et les données d'un spectre complet sont ainsi recueillies en moins d'une seconde.

Le type de détection décrite précédemment est d'un apport considérable dans la caractérisation des pics sur un chromatogramme LC/UV. Ainsi, certaines classes de métabolites secondaires de plantes (flavonoïdes, xanthones,...) pourront être mises en évidence après une simple analyse HPLC/DAD-UV.

En analyse de routine, nous utilisons une colonne Nova-Pak C₁₈ (Waters) en acier inoxydable d'une longueur de 15 cm et d'un diamètre interne de 3,9 mm. La phase stationnaire qu'elle contient est composée d'un gel de silice modifié chimiquement par greffage de résidus octadécyliques (C-18) sur les groupes silanols.

Dans le domaine de l'analyse phytochimique, l'étude de matrices complexes rend indispensable l'élution en mode gradient, afin de garder le temps d'analyse dans des limites raisonnables, tout en ne diminuant pas trop la résolution. Pour le présent travail, nous avons généralement utilisé une phase mobile binaire composée de proportions variables de méthanol (ou d'acétonitrile) et d'eau, tous de qualité HPLC (SpS, Romil), acidifiés par 0,05 % d'ac. trifluoroacétique (TFA). Les temps d'analyse étaient de 30-75 min et la pression de travail d'env. 100-150 bars.

5.2.3 Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

La chromatographie liquide à haute performance (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) combine les avantages de ces deux techniques, à savoir :

- HPLC : hautes sélectivité et efficacité de séparation,
- MS : informations structurales et sélectivité encore augmentée.

De plus, ce genre d'appareillage est assez simple d'utilisation et de moins en moins cher à l'achat et à l'entretien. Ces caractéristiques réunies en font un outil d'analyse précieux (Vékey, 2001). Généralement, on utilise des montages en série LC/UV/MS, qui permettent d'obtenir simultanément deux types d'informations spectrales.

Pour le présent travail, les analyses LC/UV/MS ont été menées sur l'appareillage constitué des éléments suivants :

- un système HPLC HP-1100 (dégazeur, pompe, injecteur et détecteur DAD-UV) permettant l'élution en mode gradient, équipé d'un échantillonneur automatique et contrôlé par le logiciel HP ChemStations ;
- une interface de type APCI (ionisation chimique à pression atmosphérique, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) nécessaire pour éliminer la phase éluante avant l'ionisation ;
- un spectromètre de masse LCQ (Finnigan MAT) à analyseur à piège d'ions (*ion trap*) contrôlé par le logiciel Xcalibur.

Les paramètres opératoires APCI-MS généraux sont les suivants : génération d'ions positifs ; courant de décharge de l'électrode (*corona discharge*) : 5,0 μA ; température du vaporisateur : 450 °C ; pression du gaz de nébulisation (*sheath gas* ; N_2) : 80 psi ; température du capillaire : 200 °C. Les ions obtenus en mode positif sont de type $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Les débits élevés compatibles avec ce mode d'ionisation (jusqu'à 2 ml/min) en font une technique de choix pour la mise en œuvre du couplage avec la chromatographie liquide.

En spectrométrie de masse tandem à plusieurs étapes (*multiple stage tandem mass spectrometry*, MS^n), les ions d'intérêt sont isolés dans l'analyseur à piège d'ions et sélectivement excités pour produire des fragments qui sont à leur tour détectés. Cette opération, abrégée MS^2 , peut être répétée sur les fragments, générant ainsi des spectres MS^n à plusieurs étapes.

5.2.4 Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (LC/NMR)

La LC/NMR est une technique complémentaire à la LC/UV/MS, permettant une analyse structurale *on-line* détaillée des constituants d'extraits végétaux ou de fractions enrichies (Wolfender *et al.*, 2001). Cette technique très récente a été utilisée dans le cadre du présent travail pour en montrer les potentiels d'application dans la caractérisation *on-line* d'extraits bruts.

Les analyses LC/ 1H -NMR ont été réalisées dans notre laboratoire sur un montage comprenant les éléments suivants, placés en série :

- un système HPLC constitué d'une pompe ternaire 9012 (Varian), d'un injecteur (Valco) et d'une colonne souple μ Bondapak C_{18} (10 μ m ; 100 x 8,0 mm d.i. ; Waters) disposée dans un module à compression radiale Waters RCM 8 x 10 ;
- un détecteur UV-visible polychromatique 490-MS (Waters) ;
- une valve d'arrêt du flux LC (*stop-flow valve*) de type E60-220 (Valco) ;
- une sonde LC/NMR Microflow (Varian) munie d'une cellule de mesure de 60 μ l (d.i. 3 mm), placée dans la zone de détection d'un spectromètre NMR UNITY Inova 500 (Varian).

Le logiciel LC Star (Varian) permet de contrôler les paramètres de la séparation LC et de l'acquisition du signal UV, ainsi que la commande de la valve *stop-flow*. Cette dernière est reliée à la sonde LC/NMR par un capillaire de transfert en PEEK (*Poly Ethyl Ether Ketone*) d'un diamètre interne de 0,13 mm et d'une longueur d'env. 2 m. L'acquisition des données NMR est prise en charge par le logiciel Solaris (Varian) installé sur une station de travail Sun. L'acétonitrile LC/NMR (Romil) et l'eau lourde à 99,8 % (D₂O ; D^r Glaser SA) ont été utilisés pour la séparation LC. Les signaux de ces solvants ont été supprimés avec une séquence d'impulsions WET (*Water suppression Enhanced through T₁ effects* ; Smallcombe *et al.*, 1995).

5.2.5 Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de dichroïsme circulaire (LC/CD)

Le dichroïsme circulaire (CD, DC en français) est la propriété que possèdent les substances optiquement actives d'absorber différemment la lumière polarisée circulaire gauche et la lumière polarisée circulaire droite à une longueur d'onde donnée. Les spectres obtenus représentent le CD molaire ($\Delta\epsilon$), comme une fonction de la longueur d'onde. Les pics et les vallées observées sur le tracé sont appelés « effets Cotton » et peuvent être positifs (pics) ou négatifs (vallées). Leur position sur le spectre dépend du type de transition électronique impliquée dans l'effet ($n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, 1Lb, 1La,...). Le CD s'exprime par l'équation :

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = \frac{\Delta A}{c \cdot l}$$

ΔA = absorbance circulaire dichroïque,

$\Delta\epsilon$ = dichroïsme circulaire molaire ou absorptivité dichroïque molaire différentielle en $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,

$\epsilon_{L/R}$ = absorbances molaires des lumières polarisées gauche (L) et droite (R) en $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$,

c = concentration de la solution à examiner en mol/l,

l = trajet optique de la solution à examiner en cm.

Le couplage LC/CD a été utilisé pour déterminer la stéréochimie des centres asymétriques de chacun des 2 isomères de biflavonoïde du mélange **D**. Cette expérience a été menée dans le Département de Chimie Organique du Prof. Sándor Antus à l'Université de Debrecen (Hongrie) par le D^r Tibor Kurtán. L'appareillage utilisé comprend :

- un système HPLC constitué d'une pompe Jasco PU-980 et d'un détecteur DAD-UV Jasco MD-910 ;
- un spectropolarimètre CD (dichrographe) J-810 équipé d'une cellule de détection HPLC ;
- une colonne Symmetry C₁₈ (4 µm ; 300 x 4,0 mm d.i. ; Waters).

20 µl d'une solution méthanolique à 1 mg/ml du mélange **D** ont été injectés pour l'analyse LC/CD et l'élution s'est faite en mode isocratique avec le système de solvants ternaire suivant : MeCN-H₂O-MeOH 29,3:68,3:2,4.

5.3 Techniques de séparation préparatives

5.3.1 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

La méthode généralement utilisée en première intention pour le fractionnement d'extraits bruts ou de fractions complexes est la chromatographie sur colonne ouverte. Les mécanismes de séparation sont les mêmes que ceux qui ont été décrits pour la TLC (*cf.* 5.2.1). La taille de la colonne, la granulométrie de la phase stationnaire et la composition initiale de la phase mobile sont déterminées d'après la quantité et la qualité de l'échantillon à fractionner (extrait brut ou fraction enrichie) et au moyen d'analyses TLC préalables (Hostettmann *et al.*, 1997). Dans le présent travail, la phase stationnaire est du Silicagel 60 (Merck) de granulométrie 35-70 µm ou 70-230 µm.

Le conditionnement manuel d'une colonne commence par le dépôt d'un coton hydrophile dans l'embouchure d'écoulement. La phase stationnaire est mise en suspension dans l'éluant de départ (boue, *slurry*) et versée dans la colonne en plusieurs fois jusqu'à stabilisation au niveau désiré. L'échantillon à fractionner est adsorbé sur une quantité de phase stationnaire correspondant à 2-3 fois sa masse, puis déposé soigneusement à la surface du gel de silice. Le tout est ensuite recouvert d'une fine couche protectrice de sable.

Les phases mobiles pour colonnes ouvertes utilisées dans ce travail sont des mélanges binaires ou ternaires à base de méthanol, de chloroforme et d'eau. La composition de l'éluant de départ est déterminé par analyse TLC, en essayant de faire migrer les substances d'intérêt à un R_f d'env. 0,3. L'élution se fait en mode gradient et les dernières fractions sont lixiviées avec du méthanol pur. Le débit varie en fonction du type de séparation souhaité et peut aller d'env. 1 ml/min (fractions enrichies) à 10 ml/min (extrait brut). Les fractions sont récupérées dans des tubes à essai (10-250 ml) disposés sur un collecteur (ISCO Retriever II, Büchi B-683). L'analyse par TLC du contenu des tubes permet finalement de réunir rationnellement les fractions avant d'éliminer les solvants à l'évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor).

5.3.2 Filtration sur gel

La filtration sur gel, ou chromatographie d'exclusion, repose sur la séparation de constituants en mélange en fonction de leur poids moléculaire et de leur structure spatiale (Hostettmann *et al.*, 1997). Dans notre laboratoire, nous utilisons un gel de dextrane hydroxypropylé réticulé, le Sephadex LH-20 (Pharmacia), pour le fractionnement de mélanges simples ou la purification de produits. Le système de solvant employé dans le présent travail expérimental est un mélange binaire MeOH-eau (5:1) et le débit est réglé au minimum (env. 10 ml en 15 min). Les fractions sont récoltées dans des tubes à essai de 10 ml disposés sur un collecteur Retriever II (ISCO).

5.3.3 Chromatographie liquide à basse pression (LPLC, Lobar)

Le principe de la chromatographie liquide à basse pression est similaire à celui décrit pour la HPLC (*cf.* 5.2.2), à une autre échelle cependant. En effet, une manipulation de LPLC se déroule à une pression de travail d'env. 3 bars et la quantité d'échantillon à analyser et la dimension des colonnes sont plus importantes. La résolution est par conséquent moins bonne qu'en HPLC, mais plusieurs centaines de milligrammes d'échantillon peuvent être fractionnés en une analyse. Le montage que nous utilisons se compose d'une pompe Duramat 80 (CfG ProMinent), d'un détecteur UV à longueur d'onde fixe 2238 UVICORD S II (LKB Bromma) et d'un enregistreur Pharmacia LKB·REC 1 (Pharmacia). La phase mobile utilisée dans ce travail est constituée de silice greffée avec des résidus C₁₈ (40-63 µm), conditionnée dans une colonne prête à l'emploi Lobar LiChroprep RP-18 (grandeur B : 310 x 25 mm ; Merck). Les systèmes d'élution utilisés dans ce travail étaient des mélanges binaires MeOH-H₂O, dont les proportions relatives étaient modifiées manuellement en cours d'analyse (*step gradient*). L'échantillon est introduit dans le système sous forme liquide, *i.e.* solubilisé dans un solvant adéquat (compatible avec la phase mobile !). Les fractions sont récoltées dans des tubes à essai de 20 ml disposés sur un collecteur Retriever II (ISCO).

5.3.4 Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)

Cette technique de séparation, à mi-chemin entre la LPLC et la HPLC (*cf.* 5.2.2 et 5.3.3), permet de fractionner en une analyse plusieurs grammes d'un mélange complexe, avec une résolution convenable ! En MPLC, la pression de travail est comprise entre 15 et 20 bars. Dans notre laboratoire nous disposons d'installations comprenant une pompe Büchi 681, d'un détecteur à longueur d'onde fixe UV detector K 2001 (Knauer) et d'un enregistreur Pharmacia LKB·REC 1 (Pharmacia) Nous avons travaillé exclusivement avec une phase stationnaire inverse, la LiChroprep RP-18 (15-25 µm ; Merck), conditionnée dans une colonne de verre à gaine plastique (45 x 2-4 cm), adaptée à la pression de travail. Une pré-colonne à gaine métallique, remplie de phase stationnaire, permet d'alléger la charge imposée sur les parois de la colonne. Les systèmes d'élution utilisés dans ce travail étaient des

mélanges binaires MeOH-H₂O ou CHCl₃-MeOH en proportions variables. La composition de l'éluant de départ est déterminée par une analyse préalable par HPLC. Le changement de phase mobile en cours d'analyse s'effectuait manuellement (« gradient par palier », *step gradient*) ou à l'aide d'un dispositif à gradient Büchi B-687. L'échantillon, mélangé à 2-3 fois son poids de phase stationnaire, est disposé dans une cartouche d'introduction en verre, puis recouvert de sable pour remplir le volume mort. Le tout est raccordé en série dans le système à moyenne pression, juste avant la précolonne. Les fractions sont récoltées dans des cylindres de 250 ml disposés sur un collecteur Büchi 684.

5.4 Méthodes physico-chimiques

5.4.1 Mesure du point de fusion (Mp)

Les points de fusion (Mp, P.F. en français) des composés purs sont mesurés à l'aide d'un appareil à plaque chauffante Mettler FP 80/82. Une pointe de spatule du composé est déposée sur la plaque qui est progressivement chauffée. Le changement d'état est observé à l'aide d'un microscope Wild et la température correspondante relevée, sans correction.

5.4.2 Polarimétrie ($[\alpha]_D$)

La polarimétrie est une méthode d'analyse basée sur la mesure du pouvoir rotatoire, propriété que présentent certaines substances, dites optiquement actives, de dévier le plan de polarisation de la lumière polarisée linéaire. Une déviation dans le sens des aiguilles d'une montre caractérise les composés dextrogyres (+), alors que les composés lévogyres (-) entraînent une déviation opposée.

Dans notre laboratoire, le pouvoir rotatoire des composés isolés, dissous dans du méthanol, est mesuré à température ambiante grâce à un polarimètre Perkin Elmer 241 MC équipé

d'une lampe à sodium. La solution, introduite dans une cellule de 10 cm de longueur (l), est traversée par un rayon lumineux polarisé à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589,3 nm). La formule utilisée est alors la suivante :

$$[\alpha]_D^T = \frac{1000 \cdot \alpha}{l \cdot c}$$

- α = angle de rotation en degrés lu à la température T,
 l = longueur en décimètres de la cellule polarimétrique,
 c = concentration de la substance en g/l.

Dans le chapitre 5.9, les concentrations se rapportant aux mesures polarimétriques sont exprimées par convention en g/100ml.

5.4.3 Spectrophotométrie UV-visible

Les composés isolés (purs ou sous forme de mélange d'isomères) sont dissous dans du méthanol et leur spectre UV-visible est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 20, piloté par un logiciel adapté, développé par la même entreprise. Les données issues de ces mesures sont reprises dans la partie 5.9 sous la forme : $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ), où $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm représente les longueurs d'onde des maxima en nm. ϵ est l'absorbance molaire à ces longueurs d'onde, si b (couche de solution traversée) est exprimé en centimètres et c (concentration) en moles par litre dans la formule suivante (loi de Beer-Lambert) :

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b$$

Le Tableau 5.2 présente les réactifs de déplacement utilisés pour la confirmation partielle des structures des flavonoïdes **E** et **F** par spectrophotométrie UV (d'après Markham, 1982).

**Tableau 5.2 – Réactifs de déplacement pour la caractérisation des flavonoïdes
par spectrophotométrie UV-visible.**

Réactif	Mode d'utilisation et mécanisme d'action
NaOMe (base forte)	<p>Ajouter 3 gouttes d'une solution de NaOMe (2,5 g Na dans 100 ml de MeOH) à la solution méthanolique de flavonoïde.</p> <p>Ce réactif déprotone tous les groupes hydroxyles phénoliques.</p>
NaOAc (base faible)	<p>Ajouter deux pointes de spatule de NaOAc anhydre à la solution méthanolique de flavonoïde.</p> <p>Ce réactif ne déprotone que les groupes hydroxyles les plus acides, par exemple les OH-4' et OH-7.</p>
NaOAc/H ₃ BO ₃	<p>Ajouter une pointe de spatule d'acide borique à la solution méthanolique de flavonoïde additionnée de NaOAc.</p> <p>Ce réactif entraîne la formation de complexes avec les groupes <i>o</i>-dihydroxyles.</p>
AlCl ₃	<p>Ajouter 6 gouttes d'une solution méthanolique d'AlCl₃ à 5 % à la solution méthanolique de flavonoïde.</p> <p>Ce réactif entraîne la formation de complexes acido-résistants entre les hydroxyles et les cétones voisines, et des complexes acido-labiles avec les groupes <i>o</i>-dihydroxyles.</p>
AlCl ₃ /HCl	<p>Ajouter 3 gouttes de HCl à 4 M à la solution méthanolique de flavonoïde additionnée d'AlCl₃.</p> <p>Ce réactif n'entraîne la formation que des complexes hydroxy-cétoniques.</p>

Les modifications des spectres UV des composés, observées après l'adjonction des réactifs décrits ci-dessus permettent de déduire, au moins en partie, le schéma de substitution du squelette phénylchromone.

5.4.4 Spectrométrie de masse (MS)

La spectrométrie de masse (MS, SM en français) est fondée sur la mesure directe du rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires (m/z), positives ou négatives, d'ions obtenus à partir de la substance à analyser. Ce rapport est exprimé en daltons (1 Da = masse de l'atome d'hydrogène). Les ions sont formés dans la « source » de l'appareil, séparés par l'« analyseur » et finissent par atteindre le « détecteur ». Le spectre obtenu représente l'abondance relative des différentes espèces ioniques présentes, comme une fonction de m/z (Vollhardt et Schore, 1994).

Les produits purs isolés sont tous caractérisés par leurs spectres de masse obtenus en modes d'ionisation par impact électronique (EI) et d'ionisation chimique par désorption (D/CI). L'ensemble des opérations s'effectue dans une enceinte dans laquelle règne un vide poussé (10^{-3} à 10^{-6} Pa). L'appareillage utilisé dans notre laboratoire est un spectromètre de masse tandem à analyseurs quadrupolaires TSQ 700 (Finnigan MAT) dont les paramètres expérimentaux sont les suivants :

- EI : Une énergie de 70 eV est appliquée sur le filament lors des mesures. La température de la sonde augmente linéairement de 50 °C à 300 °C en 1 min, alors que les températures de la source et des quadrupôles sont maintenues respectivement à 150 °C et 70 °C.
- D/CI : De l'ammoniac à une pression de 7-8 Torr dans la source est utilisé comme gaz réactif pour générer des ions positifs. La température de la sonde augmente linéairement de 50 °C à 1000 °C en 1 min, alors que les températures de la source et des quadrupôles sont maintenues respectivement à 150 °C et 70 °C.

Si les mesures EI produisent rarement des ions moléculaires en abondance, elles sont par contre une importante source d'information sur les processus de fragmentation et donc sur la structure des composés étudiés. Quant à l'ionisation chimique, elle permet de détecter la masse moléculaire lorsque l'ion M^+ est absent du spectre EI. Lors de la production d'ions

positifs en mode D/CI, on observe fréquemment l'ion $[M+H]^+$ (ion de la molécule protonée), mais les ions $[M-H]^+$ ou $[M+NH_4]^+$ peuvent aussi être présents. L'ionisation chimique ne produit que peu de fragments, ce qui est favorable à l'analyse de traces, mais réduit les informations structurales obtenues (Vékey, 2001).

Dans le cas des produits nouveaux, des mesures en spectrométrie de masse à haute résolution sont nécessaires, afin de confirmer leur formule chimique brute. Ces analyses sont menées par le Laboratoire de Chimie Organique du Prof. T. Jenny à l'Université de Fribourg sur un spectromètre de masse à électrospray Bruker FTMS 4.7T BioAPEX II (hrESI-MS).

5.4.5 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (NMR)

La méthode de choix pour l'identification des composés naturels isolés est la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (NMR, RMN en français), qui repose sur la propriété qu'ont des noyaux tels que 1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{17}O , ^{19}F et ^{31}P de posséder un moment magnétique nucléaire permanent. Placés dans un champ magnétique extérieur, ils prennent par rapport à celui-ci certaines orientations bien définies auxquelles correspondent des niveaux d'énergie distincts. Pour une valeur donnée de champ, des transitions entre niveaux immédiatement contigus sont dues à l'absorption de radiations électromagnétiques de longueurs d'onde caractéristiques dans la région des radiofréquences (Vollhardt et Schore, 1994).

Dans notre institut, les mesures de NMR sont effectuées sur spectromètre à impulsions UNITY Inova 500 de Varian, piloté par le logiciel Solaris VNMR du même fabricant installé sur une station de travail Sun. Sur ce type d'appareil, toutes les transitions sont excitées simultanément par irradiation avec une impulsion multifréquence (large bande), puis l'ordinateur transforme les interférogrammes ainsi obtenus en un spectre conventionnel par une opération mathématique (transformée de Fourier). Les déplacements chimiques δ des différents signaux sont exprimés en ppm par rapport au signal de référence du standard interne, le tétraméthylsilane (TMS). Pour chaque élément possédant un moment magnétique nucléaire permanent, ces déplacements sont caractéristiques de son environnement nucléaire

et électronique dans la molécule. Les solvants deutériés utilisés pour les mesures NMR dans le présent travail sont le MeOH- d_4 et le DMSO- d_6 (D^r Glaser SA). La température de travail a été fixée à 30 °C.

Les spectres ^1H -NMR sont enregistrés à une radiofréquence de 499,87 MHz et les spectres ^{13}C -NMR à 125,70 MHz. Des mesures complémentaires, dites « bidimensionnelles », sont souvent nécessaires pour mettre en évidence des corrélations homo- et hétéronucléaires entre les atomes de carbone et d'hydrogène au sein des molécules analysées. Il s'agit des expériences suivantes, réalisées grâce à des programmes de séquences d'impulsions fournis par Varian pour l'instrument décrit plus haut : gHMBC, gHSQC, gdqfCOSY, DEPT, gHSQCTOCSY. L'appellation DEPT regroupe en fait des spectres ^{13}C -NMR obtenus avec des angles d'impulsions θ de 90° (signaux CH positifs) et 135° (signaux CH et CH₃ positifs, CH₂ négatifs), permettant ainsi de connaître le degré de substitution des différents atomes de carbone d'une molécule.

5.5 Méthodes chimiques et biochimique de criblage

5.5.1 Réactifs de révélation chimique sur TLC

L'utilisation de réactifs chimiques en solution, vaporisés sur les chromatogrammes sur couche mince, permettent de compléter les observations faites visuellement sous les lampes UV à 254 nm (extinction de la fluorescence) et 366 nm (fluorescence propre). En effet, un choix adapté de réactifs permet non seulement de mettre en évidence des constituants ou classes de constituants présents dans un extrait (criblage général), mais offre en plus une méthode simple et rapide pour localiser un composé particulier dans un mélange (extrait, fraction enrichie,...). L'utilisation d'un réactif polyvalent est particulièrement adaptée pour réunir rationnellement les fractions primaires récoltées suite à une séparation préparative ou semi-préparative.

Le Tableau 5.3 présente les différents réactifs chimiques pour TLC utilisés dans ce travail.

Tableau 5.3 – Réactifs chimiques pour la révélation des TLC.

Réactif : subst. révélées	Mode d'utilisation
Godin (1954) : réactif polyvalent	Mélanger en parts égales une solution éthanolique de vanilline à 1% et une solution aqueuse d'acide perchlorique à 3 %. Vaporiser le mélange sur la plaque, puis une solution éthanolique d'acide sulfurique à 10 %. Après chauffage intense, les composés organiques apparaissent sous forme de taches colorées.
Chlorure de fer : tanins, polyphénols	Préparer une solution de FeCl_3 à 10 % dans un mélange $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1) et la vaporiser sur la plaque. Les polyphénols apparaissent sous forme de taches de couleur (Wagner et Bladt, 1996).
NST/PEG (Naturstoff-Polyethylenglykol) : flavonoïdes	Vaporiser successivement une solution méthanolique de diphénylboryloxy-éthylamine à 1 % (= NST) et une solution éthanolique de PEG 4000 à 5 % (= PEG) sur la plaque. Les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes orange, jaunes, bleues et vertes à 366 nm (Wagner et Bladt, 1996).
Dragendorff : alcaloïdes	Préparer une solution contenant 0,85 g de nitrate basique de bismuth et 10 g d'ac. tartrique dans 40 ml d'eau (= A) et une solution contenant 16 g de KI dans 40 ml d'eau (= B). Mélanger extemporanément 5 ml de A, 5 ml de B, 100 ml d'eau et 20 g d'acide tartrique. Vaporiser le mélange sur la plaque. Les alcaloïdes apparaissent sous forme de taches orange (Wagner et Bladt, 1996).
Acétate de plomb : coumarines	Vaporiser une solution aqueuse d'acétate de plomb à 5 % sur la plaque. Les coumarines apparaissent sous forme de taches fluorescentes vertes à 366 nm (Wagner et Bladt, 1996).

5.5.2 Mise en évidence de l'activité antiradicalaire sur le DPPH

Les radicaux libres sont produits dans notre organisme sous l'action de facteurs déclenchants externes (UV, radiations ionisantes, métaux de transition, fumées de combustion, poussières d'amiante et de silice, antiseptiques, médicaments, pesticides, solvants,...), mais également dans le cadre de phénomènes biologiques importants, comme la respiration cellulaire. Certaines cellules immunitaires (leucocytes, macrophages) utilisent quant à elles les radicaux libres pour la destruction de microorganismes infectieux dans leurs lysosomes. Parmi les radicaux libres auxquels notre organisme est exposé, on retrouve les espèces réactives de l'oxygène tels que les radicaux superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyle (OH^{\cdot}) et peroxydes (RO_2^{\cdot}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2). La production permanente de ces molécules réactives dans notre corps est généralement contrôlée par l'action de systèmes enzymatiques (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase,...) ou d'antioxydants (vitamine E, β -carotène, ...). Lorsque cet équilibre précaire est rompu en faveur des radicaux libres, il se produit un « stress oxydatif », qui va entraîner la peroxydation des lipides et l'attaque des bases azotées et des acides aminés. Par les dommages ainsi causés à nos cellules, ces différents mécanismes semblent jouer un rôle prépondérant dans les phénomènes du vieillissement et engendrer des pathologies tels que des cancers et des troubles neurodégénératifs, comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson. L'apport exogène d'antioxydants (alimentation, médicaments,...) pourrait donc ralentir, voire prévenir, ces désordres physiologiques (Cuendet, 1999 ; Demers, 1999).

Pour détecter l'activité antiradicalaire dans notre laboratoire, nous utilisons le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), un radical stable, violet en solution et présentant un maximum d'absorption caractéristique à 517 nm. Le protocole appliqué en routine repose sur la disparition de ce maximum lorsque le DPPH est réduit par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. Le test peut être effectué sur plaque TLC (évaluation qualitative ou semi-quantitative d'extraits, fractions ou produits purs) et sur microplaque à 96 puits (évaluation quantitatives de produits purs) :

- Test sur TLC (Cuendet *et al.*, 1997) :
Vaporiser sur les plaques TLC développées et séchées, une solution méthanolique de DPPH à 0,2 %. Après un temps de réaction optimal de 30 min, les composés à propriété antiradicalaire sont localisés par l'apparition de zones jaunes sur fond violet.
- Test sur microplaque (Cavin *et al.*, 1998) :
Pour chaque produit pur, préparer une solution-mère méthanolique à $4,5 \cdot 10^{-3}$ M (SM), puis en faire cinq dilutions successives d'un facteur 2 (D₁-D₅). Les opérations décrites ci-après s'effectuent en duplicat ou en triplicat pour chaque produit testé. Dans des alvéoles distinctes d'une microplaque à 96 puits (Falcon), ajouter à 5 µl de ces solutions, 225 µl de méthanol et 50 µl d'une solution méthanolique de DPPH à 0,022 % : les concentrations finales en produit pur s'échelonnent donc de 80 µM (SM) à 2,5 µM (D₅). L'avant-dernière rangée de 12 puits est utilisée pour les contrôles négatifs (230 µl MeOH + 50 µl sol. DPPH) et la dernière pour les blancs (280 µl MeOH). Après 30 min, insérer la microplaque dans un lecteur spectrophotométrique adapté (p. ex. SLT Spectra Reader) et relever les absorbances à 517 nm. Calculer ensuite les pourcentages d'activité antioxydante à l'aide de la formule :

$$\% \text{ activité} = 100 - \left[\frac{(x - b) \cdot 100}{(y - b)} \right]$$

x = absorbance de la solution de produit pur en présence de DPPH

y = absorbance moyenne des solutions de contrôle négatif

b = absorbance moyenne des solutions de blanc

Avant d'utiliser les microplaques, il convient d'en faire une mesure spectrophotométrique à vide à 517 nm. Pour chaque puits, la valeur d'absorbance à vide sera déduite de celle mesurée lors de l'expérience proprement dite. Le 2,6-di(*tert*-butyl)-4-méthylphénol (butylhydroxytoluène, BHT), un antioxydant de synthèse utilisé dans l'industrie alimentaire (E 321), et la quercétine sont utilisés comme produits de référence respectivement modérément et fortement actifs. Cette approche quantitative permet de déterminer le paramètre IC₅₀, qui représente la concentration de produit pur ayant une activité antiradicalaire de 50 %.

5.5.3 Mise en évidence de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase (AChE, EC 3.1.1.7) est l'enzyme responsable de l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine (ACh) au niveau des synapses cholinergiques. Les inhibiteurs de cette enzyme (iAChE) provoquent donc une augmentation de la transmission cholinergique, avec les effets parasympathomimétiques qui l'accompagnent. Leur usage clinique regroupe des indications telles que la maladie d'Alzheimer, le glaucome et la myasthénie grave.

Le test de l'inhibition de l'AChE mené dans notre laboratoire pour le criblage des extraits et produits naturels est le suivant (Marston *et al.*, 2002) :

Préparer une solution d'AChE à 1000 unités dans 150 ml de tampon tris de pH 7,8 (6 g/l H₂O = 0,05 M) et y ajouter 150 mg d'albumine (= sol. A). Mélanger 1 part d'une solution éthanolique d'acétate de 1-naphtyle à 250 mg/100ml et 4 parts d'une solution aqueuse de « Fast Blue Salt B » à 200 mg/80ml (= sol. B). Vaporiser la solution A sur les plaques TLC développées et séchées, puis incuber 20 min en atmosphère humide (boîte en PEHD avec un fond d'eau) à 37 °C. Vaporiser ensuite la solution B : une coloration pourpre apparaît sur la plaque TLC après 1-2 min, sauf dans les zones incolores occupées par des inhibiteurs de l'AChE. Les extraits et fractions sont déposés à raison de 100 µg, les produits purs de 10 µg.

5.6 Méthodes biologiques de criblage

5.6.1 Mise en évidence de l'activité antifongique sur *Cladosporium cucumerinum* par bioautographie directe

La moisissure *Cladosporium cucumerinum* est un champignon microscopique phytopathogène s'attaquant particulièrement au membres de la famille des Cucurbitaceae. Alors qu'il existe d'autres espèces phytopathogènes proches (p. ex. : *C. fulvum* pour la

tomate, *C. herbarum*), le genre *Cladosporium* est souvent impliqué dans des allergies respiratoires chez l'homme (Cruz *et al.*, 1997). De plus, certaines espèces peuvent être responsables d'infections cutanées (*C. carrionii* ; Elgart, 1996) ou du système nerveux central (*C. cladosporioides*, *C. bantianum* ; Salaki *et al.*, 1984).

Le test par bioautographie directe utilisé dans notre laboratoire a été décrit par Homans et Fuchs (1970) :

Vaporiser avec parcimonie sur les plaques TLC développées et soigneusement séchées, une suspension de conidies de *C. cucumerinum* (fournies par Novartis Agro) dans du bouillon de Sabouraud maltosé (Difco). Incuber pendant 3 jours à température ambiante en atmosphère humide (boîte en PEHD avec un fond d'eau). Le champignon se développe en produisant un pigment gris-vert, ce qui permet la visualisation aisée des zones d'inhibition de croissance incolores. Les extraits et fractions sont déposés à raison de 100 µg, les produits purs de 10 µg. L'amphotéricine B est utilisée comme contrôle positif (10 µg), alors que le chloramphénicol est déposé comme contrôle négatif (10 µg).

5.6.2 Mise en évidence de l'activité antifongique sur *Candida albicans* par bioautographie « agar overlay »

Candida albicans est une levure faisant partie de la flore commensale gastro-intestinale, buccale et vaginale de l'être humain. Ce champignon microscopique peut cependant devenir pathogène chez les personnes qui possèdent des mécanismes de défense naturels déficients. Les facteurs prédisposants comprennent la thérapie antibactérienne, le traumatisme cutané, le diabète, la grossesse, la chimiothérapie et l'immunodéficience. De nos jours, l'infection la plus grave et potentiellement mortelle est la candidose systémique apparaissant chez les patients à SIDA. Cliniquement, on distingue encore les infections superficielles cutanées et muco-cutanées (muguet, candidose vaginale) et les infections profondes locales (Reynolds, 1996). Si l'on considère encore le fait que les résistances du microorganisme à l'arsenal

thérapeutique existant sont de plus en plus nombreuses, on prend pleinement conscience de la pertinence du choix de *C. albicans* comme cible dans nos tests de routine.

Le test par bioautographie « *agar overlay* » utilisé dans notre laboratoire avec *C. albicans* a été mis au point par Rahalison *et al.* (1991) :

Les chromatogrammes sur couche mince sont d'abord développés sur des plaques de silicagel de 10 x 20 cm avec un support en verre. La phase mobile doit être exempte d'acide et le mélange hexane-AcOEt (1:1) remplace le mélange habituel ligroïne-AcOEt (1:1), car la qualité variable de la ligroïne peut parfois poser des problèmes pour la croissance optimale du microorganisme. Il est ensuite très important de sécher complètement les plaques afin d'éliminer toute trace de solvant. Toutes les opérations décrites ci-après sont effectuées sous flux laminaire, avec les précautions d'usage lors de la manipulation de microorganismes potentiellement pathogènes et le souci d'éviter toute contamination des milieux de culture utilisés par d'autres germes.

La souche de *C. albicans* utilisée est fournie par le D^r Michel Monod du Service de Dermatologie du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV). Après développement en boîte de Pétri sur gélose de Sabouraud (Biokar), une colonie du germe est mise en culture liquide dans 50 ml de bouillon de Sabouraud (Biokar). Après agitation pendant 1 nuit à température ambiante, 1 ml de cette solution est prélevé afin d'inoculer 50 ml d'un second milieu de culture à base de bouillon de Sabouraud. Agiter à température ambiante pendant 6 h afin d'atteindre la phase de croissance exponentielle du microorganisme. Introduire ensuite 5 ml de cette solution dans chacune des fractions de 50 ml de milieu gélosé à l'extrait de malt (Biokar), préparées et maintenues à l'état liquide à 45 °C. Ces milieux contiennent alors env. 10⁵ cellules/ml et on en prépare 20 ml par plaque de 10 x 20 cm.

La technique de l'« *agar overlay* » consiste à verser sur les plaques TLC développées, à l'aide d'une pipette stérile et en fine couche de 1-2 mm d'épaisseur, l'inoculum à base de gélose à l'extrait de malt. Ce dernier se solidifie alors en refroidissant. Après incubation pendant 1 nuit à 30 °C en atmosphère humide (boîte de PEHD avec un fond d'eau), les bioautogrammes sont révélés par vaporisation d'une solution aqueuse de bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2*H*-tétrazolium (MTT) à 2,5 mg/ml. Cette substance,

métabolisée par *C. albicans* en un dérivé formazan violet, permet de visualiser, après 4 h d'incubation dans les mêmes conditions que précédemment, les zones d'inhibition incolores sur fond violet.

Pour la conservation des bioautogrammes, de l'éthanol à 94 % est vaporisé sur les plaques pour arrêter la croissance fongique avant de les laisser sécher et de les recouvrir avec un film adhésif transparent. Les extraits et fractions sont déposés à raison de 100 µg, les produits purs de 10 µg. Le miconazole est utilisée comme contrôle positif (10 µg), alors que le chloramphénicol est déposé comme contrôle négatif (10 µg).

5.6.3 Mise en évidence de l'activité antibactérienne sur *Bacillus subtilis* par bioautographie « agar overlay »

Bacillus subtilis est une bactérie aérobie à Gram positif, sporogène, se présentant sous forme de bâtonnets généralement mobiles. Ce germe, parfois responsable de toxi-infections alimentaires ou d'infections opportunistes chez l'homme, peut être aisément manipulé de manière sûre en laboratoire. L'intérêt de son utilisation dans nos tests de routine réside dans le fait qu'une espèce voisine, *B. anthracis*, est l'agent du charbon (*anthrax* des Anglo-Saxons), souvent évoqué lorsqu'on brandit la menace de guerre bactériologique. Cette infection peut atteindre de nombreuses espèces animales (mammifères et oiseaux), y compris l'homme, mais cependant avec une nette prédilection pour les herbivores (Berche *et al.*, 1988). On peut espérer que, par réaction croisée, des molécules actives contre *B. subtilis* le soient également contre *B. anthracis* et d'autres bactéries Gram positif (streptocoques et staphylocoques).

Le test par bioautographie « *agar overlay* » utilisé dans notre laboratoire avec *B. subtilis*, adapté des travaux de Hamburger et Cordell (1987), est très similaire à celui qui est utilisé pour le dépistage de l'activité anti-*Candida* (cf. 5.6.2) :

Les chromatogrammes sont développés de la même manière que pour le test avec *C. albicans* (plaques à support de verre) et les manipulations ultérieures se font également sous flux laminaire avec les précautions d'usage décrites auparavant.

La souche de *B. subtilis* utilisée (ATCC 6633) est obtenue chez Sigma. Après développement en boîte de Pétri sur gélose de Luria-Bertani (10 g/l tryptone + 5 g/l extrait autolytique de levure + 10 g/l NaCl + 15 g/l agar bactériologique type A ; Biokar), une colonie du germe est prélevée et mise en culture liquide dans 50 ml de bouillon de Luria-Bertani (gélose de Luria-Bertani *sans* l'agar). Après agitation pendant 1 nuit à température ambiante, un volume de 0,5 ml de cette solution est prélevé afin d'inoculer 50 ml d'un second milieu de culture à base de bouillon de Luria-Bertani. Agiter à température ambiante pendant 8 h afin d'atteindre la phase de croissance exponentielle du microorganisme. Introduire ensuite 0,5 ml de cette solution dans chacune des fractions de 50 ml de gélose de Luria-Bertani, préparées et maintenues à l'état liquide à 45 °C. Ces milieux contiennent alors env. 10^8 cellules/ml et on en prépare 20 ml par plaque de 10 x 20 cm.

L'inoculum à base de gélose de Luria-Bertani est versé en fine couche (1-2 mm) sur les plaques TLC et se solidifie en refroidissant. Après incubation pendant 1 nuit à 30 °C en atmosphère humide (boîte de PEHD avec un fond d'eau), les bioautogrammes sont révélés par vaporisation d'une solution aqueuse de bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2*H*-tétrazolium (MTT) à 2,5 mg/ml. Cette substance est presque instantanément métabolisée par *B. subtilis* en un dérivé formazan violet, permettant ainsi de visualiser les zones d'inhibition incolores sur fond violet.

Pour la conservation des bioautogrammes, de l'éthanol à 94 % est vaporisé sur les plaques pour arrêter la croissance bactérienne avant de les laisser sécher et de les recouvrir avec un film adhésif transparent. Les extraits et fractions sont déposés à raison de 100 µg, les produits purs de 10 µg. Le chloramphénicol est utilisé comme contrôle positif (10 µg).

5.6.4 Mise en évidence de l'activité larvicide sur *Aedes aegypti*

La fièvre jaune est historiquement la première maladie humaine attribuée à un virus. Le nom de la maladie trouve son origine dans un symptôme fréquent associé aux cas graves : la jaunisse. Ce flavivirus (arbovirus) est transmis d'un hôte vertébré à un autre par le moustique *Aedes aegypti*, à l'intérieur duquel il se multiplie. L'insecte vecteur reste ainsi infecté à vie de manière asymptomatique. La fièvre jaune est endémique dans beaucoup de régions tropicales telles que le Mexique, l'Amérique du Sud et l'Afrique. La prévention et le contrôle de cette maladie impliquent la vaccination et le contrôle des insectes vecteurs (Prescott *et al.*, 1995).

Le test larvicide que nous utilisons en routine dans notre laboratoire est fondé sur le principe du contrôle de la reproduction des insectes vecteurs. Il a été mis au point par Cepleanu (1993) :

Les échantillons à tester sont préparés à raison de 5,5 mg d'extrait dans 110 µl de solvant (= 50 mg/ml). On utilise le DMSO pour les extraits lipophiles et l'eau pour les extraits très polaires (EtOH, eau). Les œufs de *Aedes aegypti* déposés sur un disque de papier filtre sont fournis par l'Institut Tropical Suisse de Bâle. Un morceau de papier filtre est découpé et incubé pendant à 27 °C dans de l'eau non chlorée. L'éclosion se produit après quelques heures et après 24 h les larves, au stade II de leur développement, sont prêtes pour le test.

Dans un tube à essai gradué à 10 ml contenant env. 5 ml d'eau non chlorée, ajouter 100 µl de solution d'extrait. Prélever 20 larves à l'aide d'une pipette pasteur et les introduire dans le tube, avant d'ajuster le volume final à 10 ml avec d'eau non chlorée. On a alors une solution contenant 500 µg/ml d'extrait (= 500 ppm) et 1 % de DMSO dans le cas des extraits lipophiles. Incuber ensuite à 27 °C à l'abri de la lumière. Observer le taux de mortalité après 30 min et 24 h, à l'œil nu en tenant le tube près d'une source lumineuse. Les larves vivantes sont très mobiles alors que les larves mortes tombent au fond du tube. Une mortalité de 100 % caractérise un extrait digne d'intérêt, dont l'activité larvicide doit être évaluée plus avant. On peut alors effectuer une série de dilutions géométriques de la solution d'extrait (500, 250, 125, 62,5, 31,2 et 15,6 ppm) afin de déterminer la concentration minimale létale à 100 % (LC₁₀₀). L'activité larvicide de produits purs peut être évaluée de la même manière.

5.6.5 Mise en évidence de l'activité molluscicide sur *Biomphalaria glabrata*

Les schistosomias (bilharzioses) sont des maladies parasitaires provoquées par des trématodes (ou douves) du genre *Schistosoma*. Leur importance en termes socioéconomiques et de santé publique les place au deuxième rang derrière la malaria dans les zones tropicales et subtropicales. Plus de 200 millions de personnes sont infectées à travers le monde dans 74 pays en voie de développement (site web de l'OMS : www.who.int). Les trois espèces les plus souvent impliquées sont *S. haematobium* (schistosomiase urinaire), *S. japonicum* (schist. artérioveineuse) et *S. mansoni* (schist. intestinale). L'infection de l'homme se produit dans des étendues d'eau stagnante infestées, par pénétration à travers la peau lésée ou les muqueuses du parasite sous forme de cercaire (larve). Ce stade de développement est atteint par le microorganisme après un séjour à l'intérieur d'un hôte intermédiaire mollusque, par exemple l'escargot *Biomphalaria glabrata* pour *S. mansoni* (Prescott *et al.*, 1995).

Le test molluscicide que nous utilisons en routine dans notre laboratoire est fondé sur le principe du contrôle de la reproduction de l'hôte intermédiaire. Il a été décrit par Hostettmann *et al.* (1982) :

La cible biologique est le mollusque de l'espèce *B. glabrata*, que nous élevons en aquarium avec une circulation continue d'eau filtrée à 24 °C. Deux escargots, dont le diamètre moyen de la coquille est de 9 mm, sont plongés dans une solution aqueuse de l'extrait à tester à 400 ppm. La mortalité est déterminée après 24 h par observation des battements cardiaques sous la loupe binoculaire. Pour les substances actives, des tests de détermination de la concentration minimale active peuvent être menés sur des solutions d'extrait obtenues par dilution géométrique.

5.7 Réactions chimiques simples

5.7.1 Acétylation

Cette dérivatisation est menée sur les composés **A** et **D**, afin de confirmer les hypothèses structurales avancées dans ces cas.

10 mg de produit pur sont dissous dans 2 ml d'un mélange anhydride acétique/pyridine (1:1) et le tout est agité pendant 24 h à température ambiante. L'avancement de la réaction est suivi par TLC sur silice, avec un éluant constitué d'un mélange CHCl₃-MeOH-eau (65:35:5). Le mélange réactionnel est ensuite versé dans env. 20 ml d'eau glacée, avant d'opérer un partage avec l'acétate d'éthyle. Après lavage de la fraction organique par une solution aqueuse de CuSO₄ à 2,5%, afin d'ôter toute trace de pyridine de manière inodore, l'acétate d'éthyle est éliminé à l'évaporateur rotatif (Büchi).

5.7.2 Méthylation

Cette dérivatisation est menée sur le biflavonoïde **G**, afin de confirmer la liaison C-3/C-8'' entre les unités flavanone et dihydroflavonol.

10 mg de composé pur sont dissous dans 1 ml de méthanol. Après adjonction de 10 ml d'une solution éthanolique de diazométhane (CH₂N₂) à 35 mM, le mélange est agité à température ambiante pendant 4 h. L'avancement de la réaction est suivi par TLC sur silice, avec un éluant constitué d'un mélange CHCl₃-MeOH-eau (65:35:5). Les solvants sont éliminés à l'évaporateur rotatif (Büchi) et on obtient ainsi le dérivé perméthylé du composé de départ.

5.7.3 Hydrolyse acide

Cette réaction permet d'obtenir les sucres libres à partir des *O*-glycosides et est utilisée pour confirmer l'identité de la partie osidique par TLC et, dans le cas des flavonoïdes, pour confirmer les sites de liaison des sucres par l'analyse spectrale UV-visible.

1 mg de composé pur est dissout dans 5 ml d'ac. chlorhydrique 2 N, puis maintenu à reflux pendant 1 h. L'identité de la partie osidique est confirmée par une analyse TLC sur silice (AcOEt-MeOH-eau-AcOH, 65:15:15:20) du mélange réactionnel, en comparaison avec des échantillons de référence. Le réactif utilisé pour la détection différenciée des sucres est le suivant : 0,5 g de diphénylamine sont dissous dans 25 ml de méthanol, puis 0,5 ml d'aniline et 2,5 ml d'ac. *o*-phosphorique à 85% sont ajoutés (= réactif à la diphénylamine). Une fois ce mélange vaporisé sur la plaque, on la chauffe doucement jusqu'à l'apparition de taches colorées caractéristiques pour chaque sucre.

5.8 Dosage des tanins dans *Gnidia involucrata*

5.8.1 Principe

Ce dosage a été réalisé selon la monographie « Détermination des tanins dans les drogues végétales » de la Pharmacopée Européenne 3 – Addendum 2001 (§ 2.8.14, p.107). Il s'agit de la méthode dite « à la poudre de peau », combinée à une détermination spectrophotométrique. La réaction colorée utilisée est la réduction, par les groupes hydroxyles des polyphénols, de l'acide phosphomolybdotungstique en un complexe bleu-gris (dismutation du tungstène).

Pour la détermination des polyphénols totaux, on fait réagir une prise aliquote de l'extrait aqueux de la drogue avec l'acide phosphomolybdotungstique et l'absorbance du produit de réaction est mesurée à la longueur d'onde de son maximum (A_1). Une prise aliquote identique est traitée avec la « poudre de peau », sur laquelle les tanins vont être adsorbés. On fait

ensuite réagir le filtrat exempt de tanins avec l'acide phosphomolybdotungstique et l'absorbance du produit de réaction est mesurée à la longueur d'onde de son maximum (A_2).

La différence entre les deux absorbances (A_1-A_2) permet de calculer la teneur en tanins exprimés en pyrogallol, après qu'une quantité précise de pyrogallol a été traitée dans les mêmes conditions que ci-dessus avec l'acide phosphomolybdotungstique (A_3).

5.8.2 Mode opératoire

Introduire env. 0,750 g de drogue broyée dans un ballon de 250 ml, ajouter 150 ml d'eau et chauffer au bain-marie pendant 30 min. Après refroidissement, transvaser quantitativement dans un ballon jaugé de 250 ml et compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau. Filtrer la suspension décantée et utiliser le filtrat, exceptés les premiers 50 ml, pour la suite des manipulations. Chaque mesure est effectuée en triplicat et on utilise les moyennes pour le calcul final.

Pour la détermination des polyphénols totaux, prélever 5,0 ml du filtrat et compléter à 25,0 ml avec de l'eau. Prélever 2,0 ml de cette solution, ajouter 1,0 ml de réactif phosphomolybdotungstique (Ph. Eur. 3 – Addendum 2001, § 4.1.1 Réactifs, p. 252) et 10,0 ml d'eau. Mélanger et compléter à 25,0 ml avec une solution de carbonate de sodium à 290 g/l. Mesurer l'absorbance à 760 nm (A_1) après 30 min en utilisant l'eau comme liquide de compensation (*cf.* 5.4.3).

Pour la détermination des polyphénols non adsorbés par la poudre de peau, ajouter 0,10 g de poudre de peau (Merck) à 10,0 ml du filtrat et agiter fortement pendant 1 h. Filtrer, prélever 5,0 ml du filtrat et compléter à 25,0 ml avec de l'eau. Prélever 2,0 ml de cette solution, ajouter 1,0 ml de réactif phosphomolybdotungstique et 10,0 ml d'eau. Mélanger et compléter à 25,0 ml avec une solution de carbonate de sodium à 290 g/l. Mesurer l'absorbance à 760 nm (A_2) après 30 min en utilisant l'eau comme liquide de compensation.

Pour la mesure de la solution témoin, dissoudre immédiatement avant l'emploi env. 50,0 mg de pyrogallol dans de l'eau et compléter à 100,0 ml avec le même solvant. Prélever 5,0 ml de cette solution et compléter à 100,0 ml avec de l'eau. Prélever 2,0 ml de cette solution, ajouter 1,0 ml de réactif phosphomolybdotungstique et 10,0 ml d'eau. Mélanger et compléter à 25,0 ml avec une solution de carbonate de sodium à 290 g/l. Mesurer l'absorbance à 760 nm (A_3) après 30 min en utilisant l'eau comme liquide de compensation.

La teneur pour cent en tanins exprimés en pyrogallol est calculée à l'aide de l'expression :

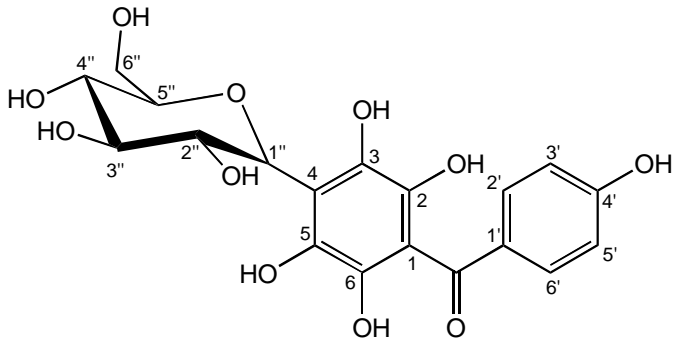
$$\frac{62,5(A_1 - A_2)m_2}{A_3 \cdot m_1}$$

m_1 = masse de la prise d'essai en grammes

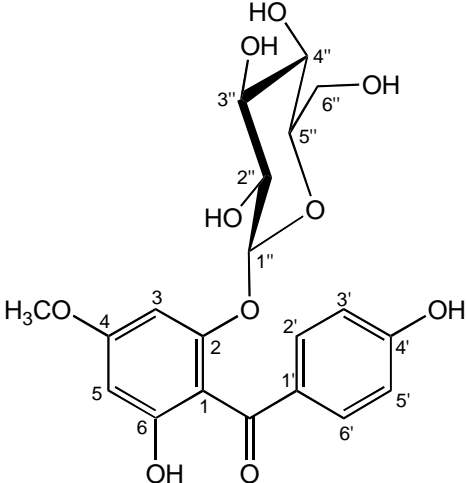
m_2 = masse de pyrogallol en grammes

5.9 Constantes physiques et données spectrales des composés isolés

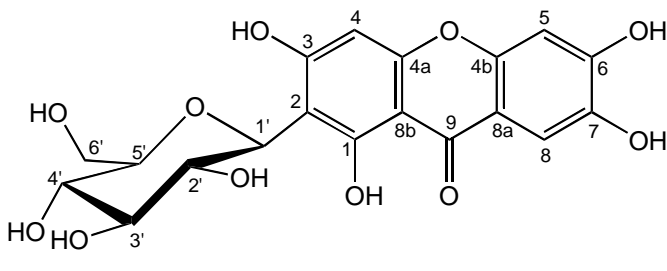
Composé A

	<p>4-C-β-glucosyl-2,3,4',5,6-pentahydroxybenzophénone</p> <p>$C_{19}H_{20}O_{11}$, M_r 424 ;</p> <p>Mp 168-171 °C ;</p> <p>$[\alpha]_D^{21} = +21^\circ$ (MeOH ; c 0,1).</p>
<ul style="list-style-type: none"> • UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ) : 204 (2,74), 222 (ép., 2,27), 290 (2,29) ; • D/CI-MS m/z (int. rel.) : 408 $[M+H-17]^+$ (10), 391 (100), 247 (98), 196 (52), 179 (98), 137 (97), 109(98), 108 (99), 92 (38) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int. rel.) : 390 $[M-34]^{+-}$ (10), 259 (42), 245 (68), 165 (100), 153 (43), 121 (92), 93 (36) ; • APCI-MS de A nona-acétylé m/z (int.rel.) : 803 $[M+H]^+$ (18), 761 $[M+H-Ac]^+$ (100), 719 $[M+H-2Ac]^+$ (45), 677 $[M+H-3Ac]^+$ (12), 625 $[M+H-4Ac]^+$ (3) ; • 1H-NMR et ^{13}C-NMR : cf. Tableau 5.4. 	

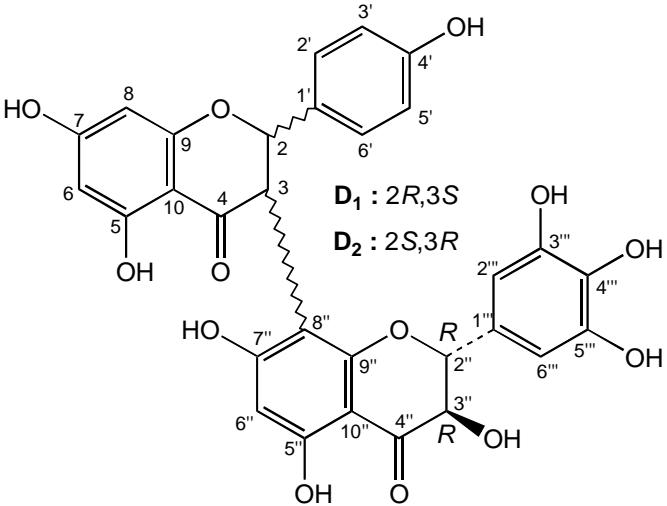
Composé B

	<p>2-O-β-glucosyl-2,4',6-trihydroxy-4-méthoxybenzophénone</p> <p>$C_{20}H_{22}O_{10}$, M_r 422 ;</p> <p>Mp 133-135 °C ;</p> <p>$[\alpha]_D^{21} = -23^\circ$ (MeOH ; c 0,1).</p>
<ul style="list-style-type: none"> • UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ) : 208 (2,51), 223 (ép., 2,21), 296 (ép., 2,02), 312 (2,06) ; • D/CI-MS m/z (int. rel.) : 440 $[M+NH_4]^+$ (44), 423 $[M+H]^+$ (100), 261 $[M+H-Glc]^+$ (100), 260 (61), 167 (10) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int. rel.) : 260 $[M-Glc]^{++}$ (77), 259 (100), 166 (50) ; • 1H-NMR et ^{13}C-NMR : cf. Tableau 5.4. 	

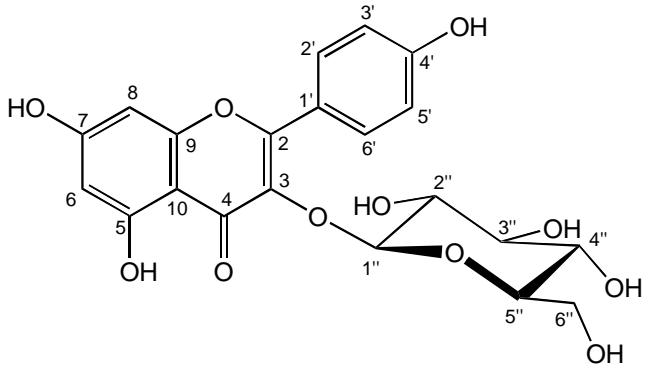
Composé C

	<p>2-C-β-glucosyl-1,3,6,7-tétrahydroxy-xanthone (mangiférine)</p> <p>$C_{19}H_{18}O_{11}$, M_r 422 ;</p> <p>Mp 272-273 °C ;</p> <p>$[\alpha]_D^{21} = +28^\circ$ (MeOH ; c 0,1).</p>
<ul style="list-style-type: none"> • UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) : 239 (3,95), 254 (3,72), 310 (3,38), 361 (3,55) ; • D/CI-MS m/z (int. rel.) : 440 $[M+NH_4]^+$ (14), 423 $[M+H]^+$ (26), 405 $[M+H-H_2O]^+$ (61), 387 $[M+H-2H_2O]^+$ (16), 369 $[M+H-3H_2O]^+$ (12), 333 $[M+H-90]^+$ (27), 303 $[M+H-120]^+$ (29), 261 $[M+H-Glc]^+$ (12), 215 (20), 180 (78), 155 (49), 138 (100), 120 (76), 107 (48) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int. rel.) : 422 $[M]^+$ (6), 404 $[M-H_2O]^+$ (19), 386 $[M-2H_2O]^+$ (14), 368 $[M-3H_2O]^+$ (34), 332 $[M-90]^+$ (11), 302 $[M-120]^+$ (13), 272 (54), 273 $[M-149]^+$ (100), 260 $[M-Glc]^+$ (69) ; • 1H-NMR et ^{13}C-NMR : cf. Tableau 5.4. 	

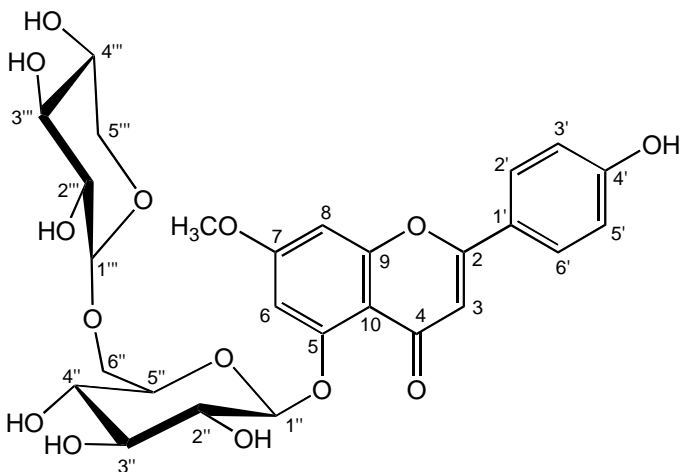
« **Composé D** » (mélange des isomères **D₁** et **D₂**)

 <p>D₁ : 2R,3S D₂ : 2S,3R</p>	<p><i>diastéréoisomères de la</i> 3'',3''',4',4''',5,5'',5''',7,7''- <i>nonahydroxy-3,8''-biflavanone</i></p> <p>$C_{30}H_{22}O_{13}$, M_r 590 ;</p> <p>Mp et $[\alpha]_D^{21}$ non déterminés (mélange).</p>
<p>(UV et CD λ_{max} nm déterminés <i>on-line</i> dans MeCN-H₂O-MeOH 29,3:68,3:2,4)</p> <p>D₁ :</p> <ul style="list-style-type: none"> UV λ_{max} nm (log ϵ) : 206 (4,90), 229 (ép., 4,56), 294 (4,32), 334 (3,99) ; CD λ_{max} nm ($\Delta\epsilon$) : 200 (-32,34), 219 (-14,29), 238 (3,06), 246 (-0,77), 279 (12,35), 302 (-11,87), 324 (ép., -2,55), 344 (1,90), 376 (0,05) ; <p>D₂ :</p> <ul style="list-style-type: none"> UV λ_{max} nm (log ϵ) : 206 (4,89), 229 (ép., 4,59), 294 (4,37), 334 (3,99) ; CD λ_{max} nm ($\Delta\epsilon$) : 204 (38,68), 217 (ép., 21,68), 236 (ép., 9,19), 256 (ép., 4,45), 292 (-20,70), 322 (3,92) ; <p>Mélange D :</p> <ul style="list-style-type: none"> D/CI-MS m/z (int. rel.) : 608 $[M+NH_4]^+$ (6), 591 $[M+H]^+$ (10), 481 (61), 465 (63), 462 (36), 429 (10), 397 (16), 287 (18), 144 (82), 127 (100) ; EI-MS, 70 eV, m/z (int. rel.) : 590 $[M]^+$, 464, 446, 297, 270, 242, 180, 166, 152, 139, 126 $[C_6H_6O_3]^+$, 97, 51 ; hrESI-MS m/z : 613,09561 $[M+Na]^+$ (calculé : 613, 09526) ; 1H-NMR et ^{13}C-NMR : cf. Tableau 5.5. 	

Composé E

	<p>3-O-β-glucosyl-4',5,7-trihydroxyflavone (3-O-β-glucosylkaempférol, astragaline)</p> <p>$C_{21}H_{20}O_{11}$, M_r 448 ;</p> <p>Mp 175-177 °C;</p> <p>$[\alpha]_D^{21} = +17^\circ$ (MeOH ; c 0,1).</p>
<ul style="list-style-type: none"> • UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ) : 267 (4,57), 301 (ép., 4,42), 349 (4,54) ; • D/CI-MS m/z (int. rel.) : 449 $[M+H]^+$ (100), 287 $[M+H-Glc]^+$ (19) ; • 1H-NMR et ^{13}C-NMR : cf. Tableau 5.6. 	

Composé F

	<p>5-O-β-xyloglucosyl-4'-hydroxy-7-méthoxyflavone (5-O-β-primevérosylgenkwanine, yuankanine)</p> <p>$C_{27}H_{30}O_{14}$, M_r 578 ;</p> <p>Mp 171-173 °C ;</p> <p>$[\alpha]_D^{21} = -5^\circ$ (MeOH ; c 0,1).</p>
<ul style="list-style-type: none"> • UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ) : 269(4,44), 336 (4,51) ; • D/CI-MS m/z (int. rel.) : 579 $[M+H]^+$ (22), 447 $[M+H-Xyl]^+$ (6), 285 $[M+H-Xyl-Gly]^+$ (100) ; • 1H-NMR et ^{13}C-NMR : cf. Tableau 5.6. 	

Composé G

	<p>3',3'',3''',4',4'',5,5'',7,7''- nonahydroxy-3,8''-biflavanone (manniflavanone)</p> <p>$C_{30}H_{22}O_{13}$, M_r 590 ;</p> <p>Mp 219-223 °C ;</p> <p>$[\alpha]_D^{21} = -15^\circ$ (MeOH ; c 0,1).</p>
<ul style="list-style-type: none"> • UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ) : 293(4,55), 335 (ép., 4,67) ; • D/CI-MS m/z (int. rel.) : 608 $[M+NH_4]^+$ (6), 591 $[M+H]^+$ (20), 573 $[M+H-H_2O]^+$ (25), 465 (62), 449 (15), 436 (10), 327 (17), 287 (38), 225 (12), 127 (100), 111 (60) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int. rel.) : 590 $[M]^+$ (7), 464 (18), 446 (10), 286 (26), 126 $[C_6H_6O_3]^+$ (100) • 1H-NMR et ^{13}C-NMR : cf. Tableau 5.5. <p>G perméthylé ($C_{39}H_{40}O_{13}$, M_r 716) :</p> <ul style="list-style-type: none"> • D/CI-MS m/z (int. rel.) : 717 $[M+H]^+$ (4), 685 $[M+H-MeOH]^+$ (57), 563 (29), 517 (25), 505 (73), 343 (17), 151 (100) ; • ^{13}C-NMR : cf. Tableau 5.5. 	

Tableau 5.4 – Données ^1H -NMR (500 MHz) et ^{13}C -NMR (125 MHz) des benzophénones A et B mesurées dans le $\text{MeOH-}d_4$ et de la xanthone C mesurées dans le $\text{DMSO-}d_6$ (δ en ppm et J en Hz).

A			B		C		
pos.	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	pos.	^1H	^{13}C
1		107,2		111,1	1		161,9
2		162,8		157,7	2		107,8
3		160,8	6,39 <i>d</i> (2,0)	94,2	3		164,0
4		104,6		163,5	4	6,38 <i>s</i>	93,5
5		160,8	6,17 <i>d</i> (2,0)	96,1	4a		156,4
6		162,8		158,3	4b		101,5
1'		133,2		131,0	5	6,87 <i>s</i>	102,8
2'	7,60 <i>d</i> (9,0)	132,8	7,69 <i>d</i> (9,0)	132,9	6		154,2
3'	6,77 <i>d</i> (9,0)	115,4	6,78 <i>d</i> (9,0)	115,3	7		143,9
4'		161,2		163,4	8	7,39 <i>s</i>	108,3
5'	6,77 <i>d</i> (9,0)	115,4	6,78 <i>d</i> (9,0)	115,3	8a		112,0
6'	7,60 <i>d</i> (9,0)	132,8	7,69 <i>d</i> (9,0)	132,9	8b		151,0
C=O		198,9		196,3	9		179,3
4-OCH ₃			3,79 <i>s</i> (3H)	55,2	1-OH	13,75 <i>s</i>	
					autres OH	10,6-10,4	
1''	4,86 <i>d</i> (8,0)	76,5	4,86 <i>d</i> (8,0)	101,8	1'	4,62 <i>d</i> (8,0)	73,3
2''	3,90 <i>m</i>	73,6	3,13 <i>dd</i> (9,0/8,0)	74,1	2'	3,24-3,16 <i>m</i>	70,8
3''	3,47 <i>dd</i> (7,0/2,5)	79,8	3,37 <i>m</i>	77,1	3'	3,24-3,16 <i>m</i>	79,2
4''	3,47 <i>dd</i> (7,0/2,5)	71,4	3,25 <i>m</i>	70,6	4'	4,05 <i>t</i> (3,5)	70,5
5''	3,39 <i>m</i>	82,5	3,37 <i>m</i>	77,6	5'	3,24-3,16 <i>m</i>	81,7
6''	3,84 <i>dd</i> (12,5/2,5)	62,4	3,85 <i>m</i>	61,9	6'	3,70 <i>d</i> (12,0)	61,7
	3,73 <i>dd</i> (12,0/5,0)		3,64 <i>dd</i> (12,0/6,0)			3,44 <i>d</i> (12,0)	

Tableau 5.5 – Données ^1H -NMR (500 MHz) et ^{13}C -NMR (125 MHz) des biflavonoïdes D1, D2, G et G perméthylé mesurées dans le DMSO- d_6 (δ en ppm et J en Hz).

pos.	D ₁		D ₂		G		G ^p
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^{13}C
2	5,63 <i>d</i> (11,5)	83,4 ^a	5,72 <i>d</i> (11,5)	84,1 ^a	5,48 <i>d</i> (12,0)	83,7 ^a	84,8 ^a
3	4,51 <i>d</i> (11,5)	47,1	4,53 <i>d</i> (11,5)	47,3	4,81 <i>d</i> (12,0)	47,3	48,9
4 (C=O)		196,8 ^b		196,8 ^b		197,2 ^b	198,8 ^b
5		163,0 ^c		163,0 ^c		163,9 ^c	165,4 ^c
6	5,85 <i>m</i>	96,3 ^d	5,85 <i>m</i>	96,3 ^d	5,97 <i>s</i> (large)	96,1 ^d	97,1 ^d
7		166,6 ^c		166,6 ^c		166,6 ^c	169,4 ^c
8	5,85 <i>m</i>	95,2 ^d	5,85 <i>m</i>	95,2 ^d	5,97 <i>s</i> (large)	95,0 ^d	96,9 ^d
9		162,4 ^c		162,4 ^c		162,8 ^c	164,1 ^c
10		101,5 ^e		101,2 ^e		101,4 ^e	103,6 ^e
1'		127,5 ^f		127,3 ^f		128,7 ^f	129,8 ^f
2'	7,18 <i>d</i> (8,0)	128,8	6,99 <i>d</i> (8,0)	129,4	7,09-6,67 <i>m</i>	114,9	114,0
3'	6,81 <i>d</i> (8,0)	115,2	6,69 <i>d</i> (7,5)	115,0		145,7	147,3
4'		158,0		158,0		145,7	147,3
5'	6,81 <i>d</i> (8,0)	115,2	6,69 <i>d</i> (7,5)	115,0	7,09-6,67 <i>m</i>	114,9	114,0
6'	7,18 <i>d</i> (8,0)	128,8	6,99 <i>d</i> (8,0)	129,4	7,09-6,67 <i>m</i>	119,6	120,6
2''	4,81 <i>d</i> (12,0)	81,7 ^a	4,10 <i>d</i> (12,0)	81,4 ^a	4,95 <i>d</i> (12,0)	81,2 ^a	82,9 ^a
3''	3,95 <i>d</i> (12,0)	72,2	4,38 <i>d</i> (12,0)	71,9	4,28 <i>d</i> (12,0)	71,8	73,7
4'' (C=O)		197,8 ^b		197,8 ^b		197,2 ^b	199,0 ^b
5''		162,4 ^c		162,4 ^c		162,8 ^c	164,1 ^c
6''	5,91 <i>m</i>	96,3 ^d	5,91 <i>m</i>	96,3 ^d	5,97 <i>s</i> (large)	96,1 ^d	97,1 ^d
7''		163,8 ^c		163,8 ^c		165,2 ^c	167,5 ^c
8''		100,4 ^e		99,9 ^e		100,1 ^e	101,1 ^e
9''		160,4 ^c		160,4 ^c		161,1 ^c	162,5 ^c
10''		101,5 ^e		101,2 ^e		101,4 ^e	103,6 ^e
1'''		127,9 ^f		127,9 ^f		128,5 ^f	129,1 ^f
2'''	6,45 <i>s</i>	107,0	6,45 <i>s</i>	107,0	7,09-6,67 <i>m</i>	114,9	114,0
3'''		145,9		145,9		145,7	147,3
4'''		133,8		133,8		145,7	147,3
5'''		145,9		145,9	7,09-6,67 <i>m</i>	114,9	114,0
6'''	6,45 <i>s</i>	107,0	6,45 <i>s</i>	107,0	7,09-6,67 <i>m</i>	119,6	120,6
5-OH/5''-OH	12,19 <i>s</i> /11,94 <i>s</i>		12,14 <i>s</i> /11,85 <i>s</i>		12,18 <i>s</i> /11,83 <i>s</i>		
autres OH	11,5-10,6		11,5-10,6		11,4-10,6		
3''-OCH ₃							59,4
autres OCH ₃							55,5

^{a-f} résonances interchangeables au sein de chaque composé et de la paire D₁/D₂

Tableau 5.6 – Données ^1H -NMR (500 MHz) et ^{13}C -NMR (125 MHz) des flavonoïdes E et F mesurées dans le DMSO- d_6 (δ en ppm et J en Hz).

pos.	E		F	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2		158,5		164,0
3		135,4	6,60 <i>s</i>	106,5
4 (C=O)		179,4		179,8
5		163,0		160,0
6	6,19 <i>d</i> (2,0)	100,0	6,85 <i>d</i> (2,0)	104,3
7		166,4		165,2
8	6,38 <i>d</i> (2,0)	95,0	6,93 <i>d</i> (2,0)	96,8
9		159,0		159,0
10		105,6		110,1
1'		122,8		122,4
2'	8,05 <i>d</i> (9,0)	132,3	7,83 <i>d</i> (8,5)	128,8
3'	6,88 <i>d</i> (9,0)	116,1	6,95 <i>d</i> (8,5)	116,6
4'		161,6		161,8
5'	6,88 <i>d</i> (9,0)	116,1	6,95 <i>d</i> (8,5)	116,6
6'	8,05 <i>d</i> (9,0)	132,3	7,83 <i>d</i> (8,5)	128,8
7-OCH ₃			3,96 <i>s</i> (3H)	56,4
1''	5,23 <i>d</i> (7,5)	104,2	4,85 <i>d</i> (7,5)	104,4
2''	3,31 <i>m</i>	75,7	3,69 <i>m</i>	73,9
3''	3,44 <i>m</i>	78,0	3,38 <i>t</i> (8,5)	76,8
4''	3,44 <i>m</i>	71,4	3,54 <i>m</i>	70,6
5''	3,20 <i>m</i>	78,4	3,54 <i>m</i>	76,5
6''	3,68 <i>dd</i> (12,0/2,0)	62,6	4,18 <i>dd</i> (14,0/2,5)	69,7
	3,54 <i>dd</i> (9,0/5,5)		3,87 <i>dd</i> (11,5/6,0)	
1'''			4,34 <i>d</i> (7,5)	104,8
2'''			3,31 <i>dd</i> (11,5/7,0)	74,0
3'''			3,67 <i>m</i>	76,6
4'''			3,57 <i>m</i>	70,3
5'''			3,93 <i>dd</i> (9,5/5,0)	66,2
			3,23 <i>dd</i> (11,5/10,0)	

6 Références

Adolf, W., Seip, E.H., Hecker, E., Dossaji, F. (1988). Irritant principles of the mezereon family (Thymelaeaceae) – V. New skin irritants and tumour promoters of the daphnane and 1- α -alkyldaphnane type from *Synaptolepis kirkii* and *Synaptolepis retusa*. *J. Nat. Prod.* **51**, 662-674.

Adolf, W., Hecker, E. (1982). On the active principles of the Thymelaeaceae – II. Skin irritant and cocarcinogenic diterpenoid factors from *Daphnopsis racemosa*. *Planta Med.* **45**, 177-182.

Agrawal, P.K. (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* **31**, 3307-3330.

Ahmed, M.S., Galal, A.M., Ross, S.A., Ferreira, D., ElSohly, M.A., Ibrahim, A.R.S., Mossa, J.S., El-Feraly, F.S. (2001). A weakly antimalarial biflavanone from *Rhus retinorrhoea*. *Phytochemistry* **58**, 599-602.

Alverson, W.S., Karol, K.G., Baum, D.A., Chase, M.W., Swensen, S.M., McCourt, R., Sytsma, K.J. (1998). Circumscription of the Malvales and relationships to other Rosidae : Evidence from *rbcL* sequence data. *Am. J. Bot.* **85**, 876-887.

APG (1998). An ordinal classification for the families of flowering plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **85**, 531-553.

Atkinson, J.E., Gupta, P., Lewis, J.R. (1968). Benzophenone participation in xanthone biosynthesis (*Gentianaceae*). *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **22**, 1386-1387.

Atkinson, J.E., Lewis, J.R. (1969). Oxidative coupling. Part VII. Biogenetic type synthesis of naturally occurring xanthenes. *J. Chem. Soc. (C)*, 281-287.

Baba, K., Tabata, Y., Taniguti, M., Kozawa, M. (1989). Coumarins from *Edgeworthia chrysantha*. *Phytochemistry* **28**, 221-225.

Baba, K., Takeuchi, K., Hamasaki, F., Kozawa, M. (1985). Three new flavans from the root of *Daphne odora* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 416-419.

Baba, K., Takeuchi, K., Kozawa, M. (1987). Chemical study on the constituents of the Thymelaeaceous plants – V. Structure of a new biflavonoid, daphnodorin from the root of *Daphne odora* Thunb. *Yakugaku Zasshi* **107**, 863-868.

- Baba, K., Takeuchi, K., Hamasaki, F., Kozawa, M. (1986). Chemical study on the constituents of the Thymelaeaceous plants – I. Structures of two new flavans from *Daphne odora* Thunb. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 595-602.
- Baba, K., Taniguchi, M., Kozawa, M. (1992). A spirobiflavonoid genkwanol B from *Daphne genkwa*. *Phytochemistry* **31**, 975-980.
- Baba, K., Taniguchi, M., Kozawa, M. (1994). Three biflavonoids from *Wikstroemia sikokiana*. *Phytochemistry* **37**, 879-883.
- Baba, K., Taniguchi, M., Kozawa, M. (1993). A third spirobiflavonoid genkwanol C from *Daphne genkwa*. *Phytochemistry* **33**, 913-916.
- Baba, K., Taniguti, M., Yoneda, Y., Kozawa, M. (1990). Coumarin glycosides from *Edgeworthia chrysantha*. *Phytochemistry* **29**, 247-249.
- Baba, K., Yoshikawa, M., Taniguchi, M., Kozawa, M. (1995). Biflavonoids from *Daphne odora*. *Phytochemistry* **38**, 1021-1026.
- Basa, S.C. (1988). Natural bicoumarins – A review. *Phytochemistry* **27**, 1933-1941.
- Beerhues, L. (1996). Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaurium erythraea*. *FEBS Lett.* **383**, 264-266.
- Berche, P., Gaillard, J.L., Simonet, M. (1988). *Bactériologie – Les Bactéries des Infections Humaines*. Flammarion Médecine-Sciences, Paris, pp. 345-353.
- Bhakuni, D.S., Bittner, M., Marticorena, C., Silva, M., Weldt, E., Hoeneisen, M. (1976). Screening of Chilean plants for anti-cancer activity – I. *Lloydia* **39**, 225-243.
- Bhakuni, D.S., Dhar, M.L., Dhar, M.M., Dhawan, B.N., Mehrotra, B.N. (1969). Screening of Indian plants for biological activity : Part II. *Indian J. Exp. Biol.* **8**, 250-262.
- Bhandari, P., Pant, P., Rastogi, R.P. (1982). Aquillochin, a coumarino-lignan from *Aquilaria agallocha*. *Phytochemistry* **21**, 2147-2149.

- Bhandari, P., Rastogi, R.P. (1981). A novel type of bicoumarin rhamnoside from *Lasiosiphon eriocephalus*. *Phytochemistry* **20**, 2044-2047.
- Bhattacharya, A.K., Das, S.C. (1971). Lasiocephalin : a new coumarin from *Lasiosiphon eriocephalus*. *Chem. Ind. (London)*, 885-886.
- Bittar, M., de Souza, M.M., Yunes, R.A., Lento, R., Delle Monache, F., Cechinel-Filho, V. (2000). Antinociceptive activity of I3,II8-binaringenin, a biflavonoid present in plants of the Guttiferae. *Planta Med.* **66**, 84-86.
- Blumberg, P.M. (1980-81). *In vitro* studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumour promoters – Parts I and II. *Crit. Rev. Toxicol.* **8**, 153.
- Blundell, M. (1987). *Collins Guide to the Wild Flowers of East Africa*. Collins, London, p. 53 et photo 270.
- Borris, R.P., Blaskó, G., Cordell, G.A. (1988). Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae. *J. Ethnopharmacol.* **24**, 41-91.
- Borris, R.P., Cordell, G.A. (1984). Studies of the Thymelaeaceae – II. Anti-neoplastic principles of *Gnidia kraussiana*. *J. Nat. Prod.* **47**, 270-278.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants : determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **186**, 343-355.
- Bors, W., Saran, M. (1987). Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radic. Res. Commun.* **2**, 289-294.
- Brooks, G., Evans, F.J. (1990). Toxic Hazards of Plants from the Families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. In : Rizk, A.M. (ed.), *Posionous Plant Contamination of Edible Plants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 27-63.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3^e édition, Technique & Documentation, Paris, pp. 274, 654-655.
- Bryan, R.F., Shen, M.S. (1978). Gnidifolin (*trans*-2-(2,4-dihydroxy-3-methoxybenzyl)-3-(4'-hydroxy-3'-methoxybenzyl)-butyrolactone. *Acta Crystallogr. B* **34**, 327-329.

Cabrera, E., García-Granados, A. (1981). Phytochemistry of Thymelaeaceae – III. Flavonoids and coumarins from *Daphne gnidium* L. *An. Quim. Series C* **77**, 31-34.

Carpenter, I., Locksley, H.D., Scheinmann, F. (1969). Xanthones in higher plants : biogenetic proposals and a chemotaxonomic survey. *Phytochemistry* **8**, 2013-2026.

Cashmore, A.R., Seelye, R.N., Cairn, B.F., Mack, H., Schmidt, R., Hecker, E. (1976). The structure of prostratin, a toxic tetracyclic diterpene ester from *Pimelea prostrata*. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 1735.

Cavin, A., Hostettmann, K., Dyatmyko, W., Potterat, O. (1998). Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Med.* **64**, 393-396.

Cepleanu, F. (1993). *Validation and application of three bench-top bioassays for screening of crude extracts and subsequent activity-guided isolation*. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, pp. 102-109.

Chakrabarti, R., Das, B. Banerji, J. (1986). Bis-coumarins from *Edgeworthia gardneri*. *Phytochemistry* **25**, 557-558.

Chari, V.M., Ilyas, M., Wagner, H., Neszmélyi, A., Chen, F.C., Chen, L.K., Lin, Y.C., Lin, Y.M. (1977). ¹³C-NMR spectroscopy of biflavonoids. *Phytochemistry* **16**, 1273-1278.

Chatterjee, A., Chakraborty, R., Das, B., Banerji, J. (1987). New coumarins from *Edgeworthia gardneri* Meissn. *Indian J. Chem. B* **26**, 81.

Cotelle, N., Moreau, S., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Hénichart, J.P. (1991). Antioxidant properties of natural hydroquinones from the marine colonial tunicate *Aplidium californicum*. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 63-68.

Cox, P.A. (1993). Saving the ethnopharmacological heritage of Samoa. *J. Ethnopharmacol.* **38**, 181-188.

Crichton, E.G., Waterman, P.G. (1979). Manniflavanone, a new 3,8-linked flavanones dimer from the stem bark of *Garcinia mannii*. *Phytochemistry* **18**, 1553-1557.

Cronquist, A. (1968). *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. Houghton Mifflin Co., Boston, pp. 238-242.

Cruz, A., Saenz de Santamaria, M., Martinez, A., Guisantes, J., Palacios, R. (1997). Fungal allergens from important allergenic fungi imperfecti. *Allergol. Immunopathol.* (Madrid) **25**, 153-158.

Cuendet, M. (1999). *Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : Fagraea blumei (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : Bartsia alpina (Scrophlariaceae), Loiseleuria procumbens (Ericaceae) et Campanula barbata (Campanulaceae).* Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, pp. 2-8.

Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fragarea blumei*. *Helv. Chim. Acta* **80**, 1144-1151.

Dahlgren, R., Thorne, R.F. (1984). The order Myrtales : circumscription, variation and relationships. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **71**, 633-699.

Das, S.C., Sengupta, S., Herz, W. (1973). Revised structure of lasiocephalin : a new coumarin from *Lasiosiphon eriocephalus* Decne. *Chem. Ind.* (London), 792-793.

Demers, J.P. (1999). Les radicaux libres : une question d'équilibre. <http://www3.sympatico.ca/diane.demers/>.

Dhar, M.L., Dhar, M.M., Dhawan, B.N., Mehrotra, B.N., Ray, C. (1968). Screening of Indian plants for biological activity : Part I. *Indian. J. Exp. Biol.* **6**, 232-247.

Dhar, M.L., Dhar, M.M., Dhawan, B.N., Mehrotra, B.N., Srimal, R.C., Tandon, J.S. (1973). Screening of Indian plants for biological activity : Part IV. *Indian. J. Exp. Biol.* **11**, 43-45.

Duddeck, H., Snatzke, G., Yemul, S.S. (1978). ¹³C NMR and CD of some 3,8''-biflavonoids from *Garcinia* species and of related flavanones. *Phytochemistry* **17**, 1369-1373.

Elgart, G.W. (1996). Chromoblastomycosis. *Dermatol. Clin.* **14**, 77-83.

Engler, A., Gilg, E. (1924). *Syllabus der Pflanzenfamilien*. 9. und 10. Auflage, Gebrueder Borntraeger, Berlin, pp. 296-308.

Erdtman, G. (1952). *Pollen Morphology and Plant Taxonomy – Angiosperms*. Chronica Botanica Co., Waltham, MA, pp. 431-433.

- Ergenç, N. (1968). The daphnin and daphnetin content of *Daphne pontica* L. *J. Fac. Pharm. Istanbul* **4**, 72-76.
- Evans, F.J., Soper, C.J. (1978). The tigliane, daphnane and ingenane diterpenes, their chemistry, distribution and biological activities. *J. Nat. Prod. (Lloydia)* **41**, 193-233.
- Evans, F.J., Taylor, S.E. (1982). Pro-inflammatory, tumour-promoting and anti-tumour diterpenes of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **44**, 1-99.
- Franz, G., Grün, M. (1983). Chemistry, occurrence and biosynthesis of C-glycosyl compounds in plants. *Planta Med.* **47**, 131-140.
- Gaffield, W. (1970). Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides – Determination of aglycone chirality in flavanones glycosides. *Tetrahedron* **26**, 4093-4108.
- García-Granados, A., Sáenz de Buruaga, J.M. (1980a). The ^{13}C NMR spectrum of 5-O- β -D-primeverosylgenkwanine. *Org. Magn. Reson.* **13**, 462-463.
- García-Granados, A., Sáenz de Buruaga, J.M. (1980b). Thymelaeaceae phytochemistry – I. Diterpenes, triterpenes and sterols of *Thymelea hirsuta* L. leaves. *An. Quim. Series C* **76**, 94-95.
- García-Granados, A., Sáenz de Buruaga, J.M. (1980c). Thymelaeaceae phytochemistry – II. Flavone and coumarin components of *Thymelaea tartonraira* L. *An. Quim. Series C* **76**, 96-97.
- Gelfand, M., Mavi, S., Drummond, R.B., Ndemera, B. (1985). *The Traditional Medical Practitioner in Zimbabwe*. Mambo Press, Gweru, pp. 191-192, 268-269 et 304.
- George, V., Rishi, A.K. (1982). Constituents of *Thymelaea passerina*. *Fitoterapia* **53**, 191-192.
- Gilg, E. (1984). Thymelaeaceae. In : Engler, A., Prantl, K. (eds.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien, Teil III, Abteilung 6a*. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, pp. 216-245.
- Godin, P. (1954). A new spray reagent for paper chromatography of polyols and cetoses. *Nature* **154**, 134.

- Gulakowski, R.J., McMahon, J.B., Buckheit, R.W. Jr., Gustafson, K.R., Boyd, M.R. (1997). Antireplicative and anticytopathic activities of prostratin, a non-tumor-promoting phorbol ester, against human immunodeficiency virus (HIV). *Antivir. Res.* **33**, 87-97.
- Gunasekera, S.P., Kinghorn, A.D., Cordell, G.A., Farnsworth, N.R. (1981). Plant anti-cancer agents – XIX. Constituents of *Aquilaria malaccensis*. *J. Nat. Prod.* **44**, 569-572.
- Gundersen, A. (1950). *Families of Dicotyledons*. Chronica Botanica Co., Waltham, MA, pp. 119-121.
- Gupta, P., Lewis, J.R. (1971). Biogenesis of xanthenes in *Gentiana lutea*. *J. Chem. Soc. (C)*, 629-631.
- Gustafson, K.R., Blunt, J.W., Munro, M.H.G., Fuller, R.W., McKee, T.C., Cardellina II, J.H., McMahon, J.B., Cragg, G.M., Boyd, M.R. (1992). The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron* **48**, 10093-10102.
- Gustafson, K.R., Cardellina, J.H. II, McMahon, J.B., Gulakowski, R.J., Ishitoya, J., Szallasi, Z., Lewin, N.E., Blumberg, P.M., Weislow, O.S., Beutler, J.A. (1992). A nonpromoting phorbol from the samoan medicinal plant *Homalanthus nutans* inhibits cell killing by HIV-1. *J. Med. Chem.* **35**, 1978-1986.
- Hamburger, M.O., Cordell, G.A. (1987). A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *J. Nat. Prod.* **50**, 19-22.
- Hansen, S.H., Jensen, A.G., Cornett, C., Bjornsdottir, I., Taylor, S., Wright, B., Wilson, I.D. (1999). High-performance liquid chromatography on-line coupled to high-field NMR and mass spectrometry for structure elucidation of constituents of *Hypericum perforatum*. *Anal. Chem.* **71**, 5235-5241.
- Harris, D.C. (1995). *Quantitative Chemical Analysis*. 4th edition, W.H. Freeman and Company, New York.
- Hecker, E. (1968). Co-carcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae. *Cancer Res.* **28**, 2338.
- Hecker, E. (1971). Isolation and characterization of the co-carcinogenic principles of Croton oil. In : Busch, H. (ed.), *Methods of Cancer Research*, Vol. vi. Academic Press, London.

Hecker, E. (1981). Co-carcinogenesis and tumour promoters of the diterpene-ester type as possible carcinogenic risk factors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **99**, 103-124.

Hegnauer, R. (1973). *Chemotaxonomie der Pflanzen – Band 6*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 508-518, 759 et 790.

Hegnauer, R. (1990). *Chemotaxonomie der Pflanzen – Band 9*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 626-639.

Heining, K.H. (1951). Studies on the floral morphology of the Thymelaeaceae. *Am. J. Bot.* **38**, 113-132.

Heywood, V.H. (1996). *Les Plantes à Fleurs*. Editions Nathan, Paris, pp. 159-160.

Homans, A.L., Fuchs, A. (1970). Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.* **51**, 327-329.

Hostettmann, K. (1997). *Tout Savoir sur le Pouvoir des Plantes, Sources de Médicaments*. Editions Favre SA, Lausanne.

Hostettmann, K. (2000). *Tout Savoir sur les Aphrodisiaques Naturels*. Editions Favre SA, Lausanne.

Hostettmann, K., Hostettmann, M. (1989). Xanthones. In : Harborne, J.B. (ed.), *Methods in Plant Biochemistry – Volume 1 : Plant Phenolics*. Academic Press, London, pp. 493-508.

Hostettmann, K., Hostettmann, M., Rodriguez, S., Wolfender, J.L. (1999). LC-Hyphenated Techniques in the Search for New Bioactive Plant Constituents. In : Cooper, R., Snyder, J.K. (eds.), *The Biology-Chemistry Interface – A Tribute to Koji Nakanishi*. Marcel Dekker, Inc., New-York, pp. 65-101.

Hostettmann, K., Kizu, H., Tomimori, T. (1982). Molluscicidal properties of various saponins. *Planta Med.* **44**, 34-35.

Hostettmann, K., Marston, M., Hostettmann, M. (1997). *Preparative Chromatography Techniques – Applications in Natural Product Isolation*. 2nd edition, Springer Verlag, Berlin, pp 10-11, 53.

Hostettmann, K., Wagner, H. (1977). Xanthone glycosides. *Phytochemistry* **16**, 821-829.

- Howard, H.T.C., Howden, M.E.H. (1975). Anti-tumor activity in *Pimelea simplex*. *Cancer Chemoth. Rep.* **59**, 585-586.
- Hurst, E. (1942). *The Poisonous Plants of New South Wales*. Snelling Printing Works Pty. Ltd., Sydney, pp. 287-294.
- Hutchinson, J. (1967). *The Genera of Flowering Plants, Vol. 2*. Oxford University Press, London, pp. 239-271.
- Inoue, T., Fujita, M. (1974). Biosynthesis of isoflavone C-glycoside in *Pueraria* root. *Chem. Pharm. Bull.* **22**, 1422-1423.
- Inoue, T., Fujita, M. (1974). Biosynthesis of puerarin in *Pueraria* root. *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 3236-3231.
- Iwu, M.M. (1993). *Handbook of African Medicinal Plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 66-67.
- Iwu, M.M., Igboko, O.A., Tempesta, M.S. (1990). Biflavonoid constituents of *Garcinia kola* roots. *Fitoterapia* **61**, 178-181.
- Jackson, B., Locksley, H.D., Scheinmann, F., Wolstenholme, W.A. (1971). Extractives from Guttiferae. Part XXII. The isolation and structure of four novel biflavanones from the heartwoods of *Garcinia buchananii* Baker and *G. eugeniifolia* Wall. *J. Chem. Soc. (C)*, 3791-3804.
- Kameda, K., Takaku, T., Okuda, H., Kimura, Y., Okuda, T., Hatano, T., Agata, I., Arichi, S. (1987). Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J. Nat. Prod.* **50**, 680-683.
- Kapoor, L.D., Singh, A., Kapoor, S.L., Srivastava, S.N. (1975). Survey of Indian plants for saponins, alkaloids and flavonoids – IV. *Lloydia* **38**, 221-224.
- Karplus, M. (1963). Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2870-2871.
- Kasai, R., Lee, K.H., Huang, H.C. (1981). Genkwadaphnin, a potent anti-leukemic diterpenes from *Daphne genkwa*. *Phytochemistry* **20**, 2592-2594.

Kitanov, G.M., Nedialkov, P.T. (2001). Benzophenone *O*-glucoside, a biogenic precursor of 1,3,7-trioxygenated xanthones in *Hypericum annulatum*. *Phytochemistry* **57**, 1237-1243.

Kogiso, S., Wada, K., Munakata, K. (1976). Odoracin, a nematocidal constituent from *Daphne odora*. *Agric. Biol. Chem.* **40**, 2119-2120.

Kokwaro, J.O. (1993). *Medicinal Plants of East Africa*. 2nd edition, Kenya Literature Bureau, Nairobi, pp.228-229.

Kosheleva, L.I., Nikonov, G.K. (1968). Phytochemical study of *Daphne mezereum*. *Farmatsiya* **17**, 40-47.

Kotani, M., Matsumoto, M., Fujita, A., Higa, S., Wang, W., Suemura, M., Kishimoto, T., Tanaka, T. (2000). Persimmon leaf extract and astragalin inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J. Allergy Clin. Immun.* **106**, 159-166.

Kupchan, S.M., Baxter, R.L. (1975). Mezerein : anti-leukemic principle isolated from *Daphne mezereum* L. *Science* **187**, 652-653.

Kupchan, S.M., Shizuri, Y., Murae, T., Sweeny, J.G., Haynes, H.R., Shen, M.S., Barrick, J.C., Bryan, R.F., van der Helm, D., Wu, K.K. (1976a). Gnidimacrin and gnidimacrin-20-palmitate, novel macrocyclic anti-leukemic diterpenoid ester from *Gnidia subcordata*. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 5719-5720.

Kupchan, S.M., Shizuri, Y., Sumner, W.C., Haynes, H.R., Leighton, A.P., Sickles, B.R. (1976b). Isolation and structural elucidation of new potent antileukemic diterpenoid esters from *Gnidia* species. *J. Org. Chem.* **41**, 3850-3853.

Kupchan, S.M., Sweeny, J.G., Baxter, R.L., Murae, T., Zimmerly, V.A., Sickles, B.R. (1975a). Gnididin, gniditrin and gnidicin, novel potent antileukemic diterpenoid esters from *Gnidia lamprantha*. *J. Amer. Chem. Soc.* **97**, 672-673.

Kupchan, S.M., Sweeny, J.G., Murae, T., Shen, M.S., Bryan, R.F. (1975b). Structure of gnidicoumarin, a novel pentacyclic dicoumarin from *Gnidia lamprantha*. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 94-95.

Lauber, K., Wagner, G. (2000). *Flora Helvetica – Flore Illustrée de Suisse*. Editions Paul Haupt, Berne, pp. 662-664.

Lee, K.H., Tagahara, K., Suzuki, H., Wu, R.Y., Haruna, M., Hall, I.H. (1981). Antitumour agents. 49. Tricin, kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside and (+)-nortrachelogenin, antileukemic principles from *Wikstroemia indica*. *J. Nat. Prod.* **44**, 530-535.

Lin, J.H., Lin, Y.T., Huang, Y.J., Wen, K.C., Chen, R.M., Ueng, T.H., Liao, C.H. (2001). Isolation and cytotoxicity of flavonoids from *Daphnis genkwae* flos. *J. Food Drug Anal.* **9**, 6-11.

Liu, G.Q., Tatematsu, H., Kurokawa, M., Niwa, M., Hirata, Y. (1984). Novel C-3/C-3''-biflavones from *Stellera chamaejasme* L. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 362-365.

Luzzi, R., Guimarães, C.L., Verdi, L.G., Simionatto, E.L., Delle Monache, F., Yunes, R.A., Floriani, A.E.O., Cechinel-Filho, V. (1997). Isolation of biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardenia* leaves. *Phytomedicine* **4**, 141-144.

Maiti, P.C., Barua, A.K., Ray, A.K., Ray, S. (1963). Triterpenes from *Daphne cannabina* Wall. *Sci. Cult.* **29**, 160-161.

Maiti, P.C., Ray, S. (1967). Triterpenes from *Daphne cannabina* (simultaneous occurrence of taraxerol, taraxerol acetate and taraxerone). *Curr. Sci.* **29**, 160-161.

Majumder, P.L., Sengupta, G.C., Dinda, B.N., Chatterjee, A. (1974). Edgeworthin, a new biscoumarin from *Edgeworthia gardneri*. *Phytochemistry* **13**, 1929-1931.

Markham, K.R. (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.

Markham, K.R., Chari, V.M. (1982). Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids. In : Harborne, J.B., Mabry, T.J. (eds.), *The Flavonoids : Advances in Research*. Chapman & Hall, London, pp. 19-134.

Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem. Anal.* **13**, 51-54.

Marston, A., Maillard, M., Hostettmann, K. (1993). Search for antifungal, molluscicidal and larvicidal compounds from African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **38**, 215-223.

Matsui, A.S., Rogers, J., Wood, Y.K., Cutting, W.C. (1967). Effects of some natural products on fertility in mice. *Med. Pharm. Exp.* **16**, 414-424.

Melchior, H. (1964). Reihe Myrtiflorae. In : Melchior, H. (ed.), *Syllabus der Pflanzenfamilien*. 12. Auflage, Gebrueder Borntraeger, Berlin, pp. 345-366.

Mendoza, C.E., Shields, J.B. (1973). Determination of some carbamates by enzyme inhibition techniques using thin layer chromatography and colorimetry. *J. Agric. Food Chem.* **21**, 178-184.

Minami, H., Kinoshita, M., Fukuyama, Y., Kodama, M., Yoshizawa, T., Sugiura, M., Nakagawa, K., Tago, H. (1994). Antioxydant xanthenes from *Garcinia subelliptica*. *Phytochemistry* **36**, 501-506.

Minami, H., Takahashi, E., Kodama, M., Fukuyama, Y., Yoshizawa, T., Nakagawa, K., (1995). Novel xanthenes with superoxide scavenging activity from *Garcinia subelliptica*. *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 347-349.

Mitchell, J., Rook, A. (1979). *Botanical Dermatology : Plants and Plant Products Injurious to the Skin*. Greengrass, Vancouver, pp. 672-676.

Miura, I., Hostettmann, K., Nakanishi, K. (1978). ¹³C-NMR of naturally occurring xanthone aglycones and glycosides. *Nouv. J. Chim.* **2**, 653-657.

Morel, I., Lescoat, G., Cogrel, P., Sergent, O., Padeloup, N., Brissot, P., Cillard, P., Cillard, J. (1993). Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin in iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 13-19.

Nakabayashi, T. (1954). Coumarin derivatives – V. Constituents of the bark of *Daphne kiusiana* Miquel and others (Thymelaeaceae). *J. Pharm. Soc. Japan* **74**, 192-193.

Niwa, M., Jiang, P.F., Hirata, Y. (1986a). Two new C-3/C-3''-biflavones from *Wikstroemia sikokiana*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 3631-3634.

Niwa, M., Otsuji, S., Tatematsu, H., Liu, G.Q., Chen, X.F., Hirata, Y. (1986b). Stereostructures of two biflavones from *Stellera chamaejasme* L. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 3249-3251.

- Nonaka, G.I., Goto, Y., Kinjo, J.E., Nohara, T., Nishioka, I. (1987). Tannins and related compounds – LII. Studies on the constituents from the leaves of *Thujopsis dolabrata* Sieb. et Zucc. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1105-1108.
- Núñez-Alarcón, J., Rodriguez, E., Schmid, R.D., Mabry, T.J. (1973). 5-*O*-xylosylglucosides of apigenin and luteolin 7- and 7,4'-methyl ethers from *Ovidia pillo-pillo*. *Phytochemistry* **12**, 1451-1454.
- Ohigashi, H., Katsumata, H., Kawazu, K., Koshimizu, K., Mitsui T. (1974). A piscicidal constituent of *Excoercaria agallocha*. *Agric. Biol. Chem.* **38**, 1093-1095.
- Pachaly, P. (1999). *Dünnschicht-Chromatographie in der Apotheke*. 1. bis 4. Lieferung, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Panizo, M., Valverde, F.S., Rodriguez, B. (1972). Some components of Torvisco roots. *Daphne gnidium* (Thymelaeaceae), *An. Quim.* **68**, 489-500.
- Peters, S., Schmidt, W., Beerhues, L. (1998). Regioselective oxidative phenol couplings of 2,3',4,6-tetrahydroxybenzophenone in cell cultures of *Centaureum erythraea* and *Hypericum androsaemum*. *Planta* **204**, 64-69.
- Potterat, O. (1997). Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Curr. Org. Chem.* **1**, 415-440.
- Prescott, L. Harley, J.P., Klein, D.A. (1995). *Microbiologie*. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles, pp. 721-722, 952-953.
- Pretsch, E., Bühlmann, P., Affolter, C. (2000). *Structure Determination of Organic Compounds – Tables of Spectral Data*. 3rd edition, Springer Verlag, Berlin.
- Principe, P.P. (1989). The Economic Significance of Plants and their Constituents as Drugs. In : Wagner, H., Hikino, H., Farnsworth N.R. (eds.), *Economic and Medicinal Plant Research, Volume 3*. Academic Press, London.
- Prox, A. (1968). Massenspektrometrische Untersuchung einiger natürlicher C-Glukosyl-Verbindungen. *Tetrahedron* **24**, 3697-3715.

Ragot, J., Tubery, P., Carreras-Jansou, M., Lattès, A., Symonds, P. (1988). Isolement de la 5-primevérosyl genkwanine des racines de *Daphne gnidium*. *Fitoterapia* **59**, 336-337.

Rahalison, L. (1994). *Mise au point et applications d'une méthode de dépistage d'activité antifongique (Candida albicans) dans des extraits végétaux*. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, p. 177.

Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., Frenk, E. (1991). A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem. Anal.* **2**, 199-203.

Rath, G., Touré, A., Nianga, M., Wolfender, J.L., Hostettmann, K. (1995). Characterization of C-glycosylflavones from *Dissotis rotundifolia* by liquid chromatography – UV diode array detection – tandem mass spectrometry. *Chromatographia* **41**, 332-342.

Ren, C.P. (1978). Long-acting analgesic antidyne in anal operations. *Nat. Med. J. China* **4**, 158-159.

Reynolds, J.E.F. ed. (1996). *Martindale – The Extra Pharmacopoeia*. Thirty-first Edition, The Royal Pharmaceutical Society, London, p. 394.

Richter, G. (1993). *Métabolisme des Végétaux – Physiologie et Biochimie*. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, p. viii.

Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Ismail, S.I. (1975). Phytochemical investigation of *Thymelea hirsuta* – III. Coumarins. *Acta Chim. Hung.* **85**, 107-115.

Roberts, H.B., McClure, T.H., Ritchie, E., Taylor, W.C., Freeman, P.W. (1975). The isolation and structure of the toxin of *Pimelea simplex* responsible for St George's disease of cattle. *Austral. Vet. J.* **51**, 325-326.

Ronlán, A., Wickberg, B. (1970). The structure of mezerein, a major toxic principle of *Daphne mezereum* L. *Tetrahedron Lett.* **1970**, 4261-4264.

Sakata, K., Kawazu, K., Misui, T. (1971a). Studies on the piscicidal constituents of *Hura crepitans* – Part I. Isolation and characterisation of huratoxin and its piscicidal activity. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 1093.

- Sakata, K., Kawazu, K., Misui, T., Masaki, N. (1971b). Studies on the piscicidal constituents of *Hura crepitans* – Part II. Chemical structure of huratoxin. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 2113.
- Sakata, K., Kawazu, K., Misui, T., Masaki, N. (1971c). The structure and stereochemistry of huratoxin : A piscicidal constituent of *Hura crepitans*. *Tetrahedron Lett.* **1971**, 1141.
- Salaki, J.S., Louria, D.B., Chmel, H. (1984). Fungal and yeast infections of the central nervous system – A clinical review. *Medicine* **63**, 108-132.
- Sandvoss, M., Pham, L.H., Levsen, K., Preiss, A., Mügge, C., Wünsch, G. (2000). Isolation and structural elucidation of steroid oligoglycosides from the starfish *Asterias rubens* by means of direct online LC-NMR-MS hyphenation and one- and two-dimensional NMR investigations. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1253-1262.
- Sato, T., Kawamoto, A., Tamura, A., Tatsumi, Y., Fujii, T. (1992). Mechanism of antioxidant action of *Pueraria* glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 721-724.
- Schaufelberger, D., Hostettmann, K. (1982). On the molluscicidal activity of tannin containing plants. *Planta Med.* **48**, 105-107.
- Schildknecht, H., Edelmann, G., Maurer, R. (1970). Zur Chemie des Mezereins, des entzündlichen und co-carcinogenen Giftes aus dem Seidelbast *Daphne mezereum*. *Chem. Ztg.* **94**, 347.
- Schmidt, W., Beerhues, L. (1997). Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum*. *FEBS Lett.* **420**, 143-146.
- Sengupta, S., Das, S.C. (1978). Structure of lasioerin : a novel coumarin from *Lasiosiphon eriocephalus* Decne (Thymelaeaceae). *Chem. Ind. (London)*, 954-955.
- Shivanand, J.D., Hoffmann, J.J., Timmermann, B.N., Schram, K.H., Cole, J.R., Bates, R.B., Klenck, R.E., Tempesta, M.S. (1983). Daphnane diterpenes from *Wikstroemia monticola* : wikstrotoxins A-D, huratoxin and excoecariatoxin. *J. Nat. Prod.* **46**, 675-680.
- Shun, Y., Cordell, G.A. (1985). Studies in the Thymelaeaceae – III. Constituents of *Gyrinops walla*. *J. Nat. Prod.* **48**, 684-685.

Shun, Y., Cordell, G.A., Cox, P.J., Howie, R.A. (1986). Wallenone, a C-32 triterpenoid from the leaves of *Gyneros walla*. *Phytochemistry* **25**, 753-755.

Silverstein, R.M., Basler, G.C., Morill, T.C. (1998). *Identification Spectrométrique de Composés Organiques*. De Boeck & Larcier s.a., Paris, pp. 3-89.

Singh, D.K., Agarwal, R.A. (1984). Correlation of the anticholinesterase and molluscicidal activity of the latex of *Euphorbia royleana* on the snail *Lymnaea acuminata*. *J. Nat. Prod.* **47**, 702-705.

Sisido, K., Kurozumi, S., Utimoto, K. (1967). Fragrant flower constituents of *Daphne odora* Thunberg. *Perfum. Essent. Oil Rec.* **58**, 528-529.

Smallcombe, S.H., Patt, S.L., Keifer, P.A. (1995). WET solvent suppression and its application to LC/NMR and high-resolution NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson. A* **117**, 295-303.

Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M. (2000). *Botanique Systématique des Plantes à Fleurs*. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, pp. 5-20.

Stahl, E., Schild, W. (1981). *Pharmazeutische Biologie – 4. Drogenanalyse II : Inhaltsstoffe und Isolierungen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 307.

Stout, G.H., Balkenhol, W.J., Poling, M., Hickernell, G.L. (1970). The isolation and structure of Daphnetoxin, the poisonous principle of *Daphne* species. *J. Amer. Chem. Soc.* **92**, 1070-1071.

Sultanbawa, M.U.S. (1980). Xanthonoids of tropical plants. *Tetrahedron* **36**, 1465-1506.

Swain, T. (1975). In : Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H. (eds.), *The Flavonoids*. Chapman & Hall, London, p. 1097.

Tanaka, T., Sueyasu, T., Nonaka, G.I., Nishioka, I. (1984). Tannins and related compounds – XXI. Isolation and characterization of galloyl and *p*-hydroxybenzoyl esters of benzophenone and xanthone C-glucosides from *Mangifera indica* L. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 2676-2686.

Tandon, S., Rastogi, R.P. (1976). Wikstromol, a new lignan from *Wikstroemia viridiflora*. *Phytochemistry* **15**, 1789-1791.

- Tandon, S., Rastogi, R.P. (1977). Wikstrosin, a tricoumarin from *Wikstroemia viridiflora*. *Phytochemistry* **16**, 1991-1993.
- Taniguchi, M., Baba, K. (1996). Three biflavonoids from *Daphne odora*. *Phytochemistry* **42**, 1447-1453.
- Taniguchi, M., Fujiwara, A., Baba, K. (1997). Three flavonoids from *Daphne odora*. *Phytochemistry* **45**, 183-188.
- Taniguchi, M., Fujiwara, A., Baba, K. Wang, N.H. (1998). Two biflavonoids from *Daphne acutiloba*. *Phytochemistry* **49**, 863-867.
- Tatematsu, H., Kurokawa, M., Niwa, M., Hirata, Y. (1984). Piscicidal constituents of *Stellera chamaejasme* L. II. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1612-1613.
- Thorne, R.F. (1968). Synopsis of a putatively phylogenetic classification of the flowering plants. *Aliso* **6**, 57-66.
- Tikhomirova, L.I., Markova, L.P., Tumbaa, Kh., Kuznetsova, G.A. (1974). Coumarins from *Stellera chamaejasme*. *Kim. Prir. Soedin.* **10**, 404.
- Torrance, S.J., Hoffmann, J.J., Cole, J.R. (1979). Wikstromol, anti-tumor lignan from *Wikstroemia uva-ursi* Gray (Thymelaeaceae). *J. Pharm. Sci.* **68**, 664-665.
- Tschesche, R., Schacht, U., Legler, G. (1963a). Über Daphnoretin, ein natürlich vorkommendes Derivat des 3,7'-Dicumaryläthers. *Liebigs Ann. Chem.* **662**, 113-125.
- Tschesche, R., Schacht, U., Legler, G. (1963b). Über Daphnorin, ein neues Cumaringlukosid aus *Daphne mezereum*. *Naturwissenschaften* **50**, 521-522.
- Tubery, P. (1968). Alcohol extract of *Lasiosiphon kraussianus* plant having lymphocytic activity, for use against leprosy. Brevet, Fr. M. 6366 (CA **74**, 91170x).
- Tubery, P. (1969). Glycoside extract of *Lasiosiphon kraussianus* useful as an anti-leprous medicament. Brevet, Fr. M. 7333 (CA **75**, 132993j).

Tyler, M.I., Howden, M.E.H. (1981). Piscicidal constituents of *Pimelea* species. *Tetrahedron Lett.* **22**, 689-690.

Tyler, M.I., Howden, M.E.H. (1985). Antineoplastic and piscicidal 1-alkyldaphnane orthoesters of *Pimelea* species. *J. Nat. Prod.* **48**, 440-445.

Ulubelen, A., Bucker, R., Mabry, T.J. (1982). Flavone 5-*O*-glucosides from *Daphne sericea*. *Phytochemistry* **21**, 801-803.

Ulubelen, A., Terem, B., Tuzlaci, E. (1986). Coumarins and flavonoids from *Daphne gnidioides*. *J. Nat. Prod.* **49**, 692-694.

Vékey, K. (2001). Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J. Chromatogr. A* **921**, 227-236.

Vickery, J.R. (1980). The fatty acid composition of seed oils from ten plant families with particular reference to cyclopropene and dihydrosterculic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **57**, 87-91.

Vickery, J.R. (1981). The occurrence of dihydromalvalic acid in some seed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 731.

Vollhardt, K.P.C., Schore, N.E. (1994). *Traité de Chimie Organique*. 2^{ème} édition, De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles, pp. 324-363, 796-809.

Von Oettingen, W.F. (1958). *Poisoning – A Guide to Clinical Diagnosis and Treatment*. 2nd edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia, p. 322.

Wada, H., Shimizu, Y., Tanaka, N., Cambie, R.C., Braggins J.E. (1995). Chemical and chemotaxonomical studies of ferns – LXXXVII. Constituents of *Trichomanes reniforme*. *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 461-465.

Wagenitz, G. (1964). 33. Reihe Thymelaeales. In : Melchior, H. (ed.), *Syllabus der Pflanzenfamilien*. 9. und 10. Auflage, Gebrueder Borntraeger, Berlin, pp. 316-322.

Wagner, H., Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. 2nd edition, Springer, Berlin.

Wang, M.S., Gaugaz, M. (1980). Studies on the chemical constituents of *Daphne giraldii* Nitsche – Part II. *Chung Ts'ao Yao* **11**, 49-54 (CA **94**, 52760h).

Waridel, P., Wolfender, J.L., Ndjoko, K., Hobby, K.R., Major, H.J., Hostettmann, K. (2001). Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. *J. Chromatogr. A* **926**, 29-41.

Watanabe, I., Yanai, T., Awano, K., Kogami, K., Hayashi, K. (1983). Volatile components of Zinchoge flower (*Daphne odora* Thunb.). *Agribiol. Res.* **47**, 483-690.

Watson, L., Dallwitz, M.J. (dès 1992). The Families of flowering plants : descriptions, illustrations, identification and information retrieval (version : 14th December 2000). <http://biodiversity.uno.edu/delta/>.

Watt, J.M., Breyer-Brandwijk, M.G. (1933). *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern Africa*. William Wood and Co., Baltimore, pp. 124-127.

Weins, C., Jork, H. (1996). Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A* **750**, 403-407.

Wenkert, E., Gottlieb, H.E. (1977). Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoid and isoflavonoid compounds. *Phytochemistry* **16**, 1811-1816.

Wolfender, J.L., Ndjoko, K., Hostettmann, K. (1999). LC/MSⁿ, a powerful method for in depth on-line structural investigation of plant constituents (Poster). 10th Fall Meeting of the New Swiss Chemical Society, Basel, Switzerland (*Chimia* **53**, 329).

Wolfender, J.L., Ndjoko, K., Hostettmann, K. (1998). LC/NMR in natural products chemistry. *Curr. Org. Chem.* **2**, 575-596.

Wolfender, J.L., Ndjoko, K., Hostettmann, K. (2001). The potential of LC/NMR in phytochemical analysis. *Phytochem. Anal.* **12**, 2-22.

Yoneda, K., Yamagata, E., Nakanishi, T., Nagashima, T., Kawasaki, I., Yoshida, T., Mori, M., Miura, I. (1986). Sesquiterpenoids in two different kinds of agarwood. *Phytochemistry* **23**, 2068-2069.

Zayed, S., Adolf, W., Hafez, A., Hecker, E. (1977a). New highly irritant 1-alkyldaphnane derivatives from several species of Thymelaeaceae. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 3481-3482.

Zayed, S., Hafez, A., Adolf, W., Hecker, E. (1977b). New tiglane and daphnane derivatives from *Pimelea prostrata* and *P. simplex*. *Experientia* **33**, 1554-1555.

Zayed, S., Adolf, W., Hecker, E. (1982). On the active principles of the Thymelaeaceae – I. The irritants and co-carcinogens of *Pimelea prostrata*. *Planta Med.* **45**, 67-77.

Zhuang, L.G., Seligmann, O., Jurcic, K., Wagner, H. (1982). Constituents of *Daphne tangutica*. *Planta Med.* **45**, 172-176.

7 Résumé

Dans le but de mieux connaître le métabolisme secondaire de la famille des Thymelaeaceae et de découvrir de nouveaux composés naturels à intérêt thérapeutique, 30 extraits provenant de 8 espèces africaines ont été soumis à un criblage chimique et biologique. Les cibles biologiques suivantes ont servi à l'évaluation de l'activité des extraits étudiés : la moisissure phytopathogène *Cladosporium cucumerinum*, la levure commensale *Candida albicans*, la bactérie opportuniste *Bacillus subtilis*, la larve du moustique vecteur de la fièvre jaune *Aedes aegypti* et l'hôte intermédiaire mollusque de la schistosomiase urinaire *Biomphalaria glabrata*. Les propriétés antiradicalaires et inhibitrices de l'acétylcholinestérase de ces extraits ont également été dépistées. Des analyses sur CCM avec révélation chimique, ainsi que des expériences LC/DAD-UV, ont permis de mettre en évidence la présence de tanins, de flavonoïdes et de xanthones dans les extraits polaires. Sur la base des résultats de ces analyses préliminaires, l'investigation phytochimique des extraits méthanoliques des racines et des parties aériennes de *Gnidia involucrata* a été entreprise. Cette démarche a permis l'isolement de 8 composés naturels et leur caractérisation complète au moyen de méthodes spectroscopiques (UV, MS, CD, ¹H- et ¹³C-NMR). Les activités de ces produits purs ont été évaluées et il est apparu qu'ils possédaient presque tous des propriétés antiradicalaires intéressantes, supérieures à celles du BHT, un antioxydant de synthèse (E 321) utilisé dans l'industrie alimentaire.

Deux benzophénones simples, respectivement *O*- et *C*-glucosylées, ont été isolées des parties aériennes de *G. involucrata* au côté de la mangiférine, une *C*-glycosylxanthone ubiquitaire. Ces découvertes sont remarquables à plusieurs titres : (1) les benzophénones simples (non-prénylées) sont très rares dans la nature ; (2) c'est la première fois qu'une *O*-glycosylbenzophénone a été décrite ; (3) aucune xanthone n'avait été mise en évidence auparavant dans la famille et (4) les benzophénones semblent ne pas être que des produits intermédiaires dans la biosynthèse des xanthones.

Trois 3,8''-biflavanones du type GB ont été isolées des racines et des parties aériennes de la même plante, dont deux stéréoisomères se trouvant en mélange. Une analyse LC/CD a permis d'attribuer les configurations absolues des quatre carbones asymétriques de chaque molécule. Cette classe de métabolites secondaires est réputée pour ses propriétés analgésiques et sa présence chez les Thymelaeaceae est prometteuse.

Des techniques couplées de pointe ont été utilisées dans ce travail et ont montré leur apport inestimable dans le domaine de la recherche phytochimique. Une analyse LC/ MSⁿ a ainsi permis de mettre en évidence *on-line* trois C-glycosylflavones – l’isoorientine, l’isovitexine et la vitexine – dans les extraits méthanoliques bruts de *G. involucrata*. De plus, les parties aériennes de cette même plante ont servi de matériel pour le développement d’une nouvelle méthode d’analyse d’extraits bruts : la LC/¹H-NMR *time-slice*. Cette approche consiste à « découper » le temps d’analyse par des interruptions régulières du flux LC, durant lesquelles les données NMR nécessaires sont acquises. Le problème de la faible sensibilité relative de la LC/NMR a été partiellement résolu par ce biais et a permis d’envisager l’utilisation de la NMR au sein de systèmes de couplages multiples en série avec d’autres méthodes spectrales (UV, MS, IR, CD,...).

8 Abstract

With the aim of acquiring a better knowledge of the secondary metabolism of the family Thymelaeaceae and of the discovering of new natural therapeutics, 30 extracts from 8 African plant species were submitted to chemical and biological screening. The following biological targets were used to estimate the activity of the extracts under study: the phytopathogenic fungus *Cladosporium cucumerinum*, the commensal yeast *Candida albicans*, the opportunistic bacteria *Bacillus subtilis*, larvae of the yellow fever-transmitting mosquito *Aedes aegypti* and the intermediate snail host of urinary schistosomiasis *Biomphalaria glabrata*. The antiradical and acetylcholinesterase-inhibiting properties of these extracts were also investigated. TLC analyses followed by chemical detection, together with LC/DAD-UV experiments, showed the presence of tannins, flavonoids and xanthenes in the polar extracts. On the basis of these results, a phytochemical investigation of the methanol extracts of the roots and the aerial parts of *Gnidia involucrata* was undertaken. This procedure led to the isolation of 8 natural products, which were then characterised by spectroscopic means (UV, MS, CD, ^1H - and ^{13}C -NMR). The activities of the pure compounds were then further evaluated: almost all of them exhibited very interesting antiradical properties, superior to those of BHT, a synthetic antioxidant (E 321) used in the food industry.

Two simple benzophenones, one *O*- and one *C*-glycosylated, were isolated from the aerial parts of *G. involucrata*, together with mangiferin, a ubiquitous *C*-glycosylxanthone. These findings are of multiple importance: (1) simple (non-prenylated) benzophenones are very rare in nature; (2) it is the first time that an *O*-glycosylbenzophenone has been described; (3) no xanthenes have been previously reported in the family and (4) benzophenones do not seem to be exclusive intermediates in the biosynthesis of xanthenes.

Three 3,8''-biflavanones of the GB type were isolated from the roots and the aerial parts of the same plant, among them two stereoisomers in mixture. A LC/CD analysis allowed the assignment of the absolute configurations of all four stereocenters in both molecules. This class of secondary metabolite is well known for its analgesic properties and its presence in the Thymelaeaceae is very promising.

Advanced hyphenated techniques were used in this work and showed their inestimable contribution to the field of phytochemical research. A LC/MSⁿ analysis, for example, allowed the *on-line* characterisation of three C-glycosylflavones – isoorientin, isovitexin and vitexin – in the crude methanol extracts of *G. involucrata*. Furthermore, the aerial parts of this plant were used as material for the development of a new analytical method for crude plant extracts: *time-slice* LC/¹H-NMR. This approach consisted in “slicing” the analytical procedure by interrupting the LC flow at given intervals, during which the necessary NMR data were acquired. The relative lack of sensitivity of LC/NMR was partially surmounted by this means, allowing one to envisage the use of NMR in a multiple hyphenated system, together with other spectroscopic methods (UV, MS, IR, CD,...)